

(12) NACH DEM VERTRAG [] DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENES [] VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Juli 2004 (01.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/054497 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61P 35/00, A61K 45/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/004233
- (22) Internationales Anmeldedatum:
16. Dezember 2003 (16.12.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 59 619.0 18. Dezember 2002 (18.12.2002) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): METAGEN PHARMACEUTICALS GMBH [DE/DE]; Odenarader Strasse 16, 13347 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PLATH, Thomas [DE/DE]; Odenarader Strasse 16, 13347 Berlin (DE). REULE, Matthias [DE/DE]; Odenarader Strasse 16, 13347 Berlin (DE). KAISER, Simone [DE/DE]; Odenarader Strasse 16, 13347 Berlin (DE). LICHTNER, Rosmarie [DE/DE]; Odenarader Strasse 16, 13347 Berlin (DE). HEIDEN CONSTANIOS-VELEZ, Esmeralda [ES/DE]; Taurogger Strasse 8, 10589 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: JUNGBLUT, Bernhard; Albrecht, Lüke & Jungblut, Gelfertstrasse 56, 14195 Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TQ)..
- Veröffentlicht:
- mit internationalem Recherchenbericht
 - vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Rechercheberichts: 23. Dezember 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Titel: USE OF A TRPM8-ACTIVATING SUBSTANCE FOR THE TREATMENT OF TUMOURS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINER TRPM8 AKTIVIERENDEN SUBSTANZ ZUR TUMORREHANDLUNG

(57) Abstract: The invention relates to the use of a TRPM8-activating substance for producing a pharmaceutical composition for the treatment of tumour diseases in which TRPM8 is over-expressed.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen, in welchen TRPM8 überexprimiert ist.

WO 2004/054497 A3

BEST AVAILABLE COPY

Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Tumorbehandlung.

5 Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von TRPM8 modulierenden Substanzen zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Die 10 Erfindung betrifft desweiteren solche Zusammensetzungen, sowie einen Behandlungsplan.

Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik

15

Folgend werden die Bezeichnungen Trpp8 und TRPM8 synonym verwendet.

Die Kalzium Homeostase regelt wichtige Zellfunktionen, wie 20 Proliferation, Differenzierung, Invasion, Migration, Angiogenese und Apoptose. Bei Prostatakrebs spielt Kalzium eine wichtige Rolle in der Tumorbildung. Es ist jedoch wenig über die Kalziumkanäle und membrangebundenen Plasma Rezeptoren bekannt, die den Eintritt und Austritt von Kalzium 25 in und aus intrazellulären Kalziumreservoirs in Prostatatumorzellen regeln.

Trpp8 ist in der Literaturstelle Tsavaler et al., Cancer Res, 61:3760-3769 (2001) als Prostata-spezifisches Gen 30 beschrieben worden, welches vorwiegend in humanen Prostatumoren exprimiert wird. Trpp8 wird signifikant hochreguliert. In Androgen-abhängigen Prostata Zelllinien wird gemäß dieser Literaturstelle Trpp8 gefunden, nicht jedoch

in Androgen-unabhängigen Zelllinien, welche auch nicht PAP (prostate acid phosphatase) und PSA (prostate specific antigen) exprimieren. Es wird vermutet, daß Trpp8 als Kalzium Kanal Protein funktioniert.

5

Trp Proteine sollen zu den sogenannten store operated calcium channels (SOC) bzw. capacitative calcium entry channels (CCE) gehören. In LNCaP Zellen konnte eine Involvierung in der Apoptose gezeigt werden (Wertz et al., J 10 Biol Chem, 275:11470-11477 (2000)).

Die 5694 bp Trpp8 cDNA hat einen 3312 bp offenen Leserahmen, welcher für ein 1104 Aminosäuren Protein mit angeblich sieben transmembranen Domänen codiert mit einem Molekulargewicht von ca. 127.500 Da.

Trpp8 Sequenzen sind in den Literaturstellen US-6,194,152, US-6,183,968, WO-99/46374, WO-99/09166, WO-01/25273, WO-01/25272, WO-01/34802, WO-01/46258, WO-01/42467 und 20 WO-01/1633 beschrieben. Die Literaturstellen US-6,194,152 und WO-01/51633 offenbaren die Verwendung der darin genannten Sequenzen zur Detektion von Tumorzellen sowie verschiedener Substanzklassen in allgemeiner Weise zur Behandlung von Prostatakrebs.

25

Menthol ist ein sekundärer Pflanzen stoff, der natürlicherweise als Monoterpen in der Pfefferminze vorkommt und den Hauptbestandteil des Pfefferminzöls ausmacht. Menthol induziert Kälteempfinden auf der Haut sowie in Mund und Nase durch Anregung bestimmter Nervenzellen. Eine weitere, 30 ein Kälteempfinden auslösende Substanz ist Icilin. Beide Substanzen aktivieren periphere Nervenzellen, wobei der Ionenkanal TRPM8 selektiv aktiviert wird und Ionen, wie

Ca²⁺ und Na⁺ in die Zelle einfließen können. Aus den Literaturstellen McKemy et al., Nature 416(6876):52-52 (2002) und Peier et al., Cell 108(5):705-715 (2002) ist es bekannt, dass das human-orthologe TRPM8 in Mäusen und Ratten als Menthol-Sensor funktioniert. Gleiches ist für Iciliin bekannt. Ferner fungiert TRPM8 als Kälterezeptor in einem Temperaturbereich von 8 °C bis 25 °C.

Eine physiologische Funktion von TRPM8 in Tumorgeweben ist unbekannt.

Insbesondere Prostatakrebs ist eine mit zunehmendem Alter mit beachtlicher Inzidenz auftretende Erkrankung. Bislang wird Prostatakrebs im wesentlichen pathologisch diagnostiziert und meist durch Entfernung der Prostata behandelt. Die Entfernung der Prostata hat verschiedene nachteilige Effekte auf einen Patienten. Eine verbesserte Diagnose und Behandlung dieser Krebsart, insbesondere ohne das Erfordernis einer Entfernung der Prostata, ist daher in hohem Maße wünschenswert.

25 Technisches Problem der Erfindung

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, pharmazeutische Zusammensetzungen zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere Prostatakrebs-Erkrankungen, anzugeben.

Grundzüge der Erfindung sowie bevorzugte Ausführungsbeispiele.

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung 5 die Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere von Prostatakrebs, in welchen TRPM8 überexprimiert ist.

10 Die Erkenntnis beruht auf der überraschenden Erkenntnis, dass in Tumoren, die eine erhöhte Expression des Ionenkanals TRPM8 aufweisen, die Aktivierung des TRPM8 das Tumorgewachstum inhibiert bzw. verlangsamt. Insbesondere eine permanente Aktivierung destabilisiert spezifisch den Ionenhaushalt der Tumorzellen, welche dadurch in die Apoptose getrieben werden.

Bevorzugt eingesetzt wird eine Substanz, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Menthol, Menthyldeivate, Pyrrolidinyl-Derivate des Furanon, Icillin, Icillin-Derivate und Mischungen dieser Substanzen". Der Begriff Menthol umfaßt alle Enantiomere sowie Mischungen der Enantiomere. Entsprechendes gilt für andere genannte Substanzen bzw. Substanzklassen mit Symmetriezentren. Des Weiteren 25 können auch strukturell von den vorstehenden Substanzen verschiedene Substanzen verwendet werden, wobei als wesentliches Auswahlkriterium die Aktivierung von TRPM8 anzusehen ist. Beispiel für eine solche verschiedene Substanz ist 2-Isopropyl-N-2,3-trimethylbutyramid.

30

Menthyldeivate können insbesondere gemäß Formel I aufgebaut sein, wobei ... eine Einfach- oder Doppelbindung sein kann, wobei ... eine Einfachbindung oder keine Bindung

sein kann, wobei nicht dargestellte Valenzen des Kohlenstoffs mit -H abgesättigt sind, wobei R₁ = -H, -OH, -SH, -NR₁₁R₁₂, C₁-C₁₀-Alkyl, -Aralkyl oder -Aryl, beispielsweise Methyl oder Ethyl, wobei R₁₁ und R₁₂ gleich oder verschieden und -H, C₁ bis C₁₀-Alkyl, -Aralkyl oder -Aryl sein können, wobei R₂ = -OR₂₁, -SR₂₁, -CO-R₂₂, oder -O-CO-R₂₃ sein kann, wobei R₂₁ = -H, C₁-C₁₀-Alkyl, -Aralkyl, -Aryl, oder C₁-C₁₀-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, nicht, einfach oder mehrfach substituiert, insbesondere -OH oder -SH substituiert, sein kann, wobei R₂₂ = -H, C₁-C₁₀-Alkyl, -Aralkyl, -Aryl, oder C₁-C₁₀-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, nicht, einfach oder mehrfach substituiert, insbesondere -OH oder -SH substituiert, oder -NR₂₂₁R₂₂₂ sein kann, wobei R₂₂₁ und R₂₂₂ gleich oder verschieden und -H, C₁ bis C₁₀-Alkyl, -Aralkyl, -Aryl, oder C₁-C₁₀-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, sein können, wobei R₂₃ = -H, C₁-C₁₀-Alkyl, -Aralkyl, -Aryl, oder C₁-C₁₀-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, nicht, einfach oder mehrfach substituiert, insbesondere -OH oder -SH substituiert, 20 -OH oder -SH substituiert, sein kann. Beispiele für Menthyllderivate sind. Isopulegol (... = Doppelbindung, ... = keine Bindung, R₂ = -OH), Menthoxypropan-1,2-diol (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R₁ = -H, R₂ = -O-CH₂-CHOH-CH₂-CH₂OH), N-Ethyl-p-menthan-3-carboxamid (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R₁ = -H, R₂ = -CO-NH-CH₂-CH₃) und p-Menthan-3,8-diol (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R₁ = -OH, R₂ = -OH). Weitere Beispiele sind 3-Menthyl-3,6-dioxaheptanoat, 3-Menthylmethoxyacetat, 3-Menthyl-3,6,9-trioxadecanoat, 30 3-Menthyl(2-hydroxyethoxy)acetat und Menthyl-11-hydroxy-3,6,9-trioxaundecanoat (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R₁ = -H, R₂ = C₁-C₁₀-Alkylpolyether mit 1 bis 5 Ethergruppen, nicht oder

-OH substituiert). Ein weiteres Beispiel ist Menthyllactat (... = Einfachbindung, ... = Einfachbindung, R₁ = -H, R₂ = -O-CO-R₂₃ und R₂₃ = Hydroxyethyl).

5 Pyrrolidinyl-Derivate des Furanon können insbesondere gemäß Formel II aufgebaut sein, wobei R₁ und R₂ zumindest einfach vorliegen, wobei die Bindung von R₁ und R₂ an jeder freien Kohlenstoffvalenz des Furanonringes erfolgen kann, wobei freie Kohlenstoffvalenzen durch Wasserstoff 10 abgesättigt sind, wobei R₁ Pyrrolidin, nicht, einfach oder mehrfach substituiert sein kann, insbesondere durch C₁-C₁₀-Alkyl, -Aralkyl, Aryl, -OH, -NH₂, wobei Pyrrolidin vorzugsweise über N an den Furanonring gebunden ist, wobei R₂ = C₁-C₁₀-Alkyl, -Aralkyl, -Aryl, -OH, -NH₂ sein kann, 15 und wobei vorzugsweise R₂ einfach oder zweifach vorliegt und wobei R₁ vorzugsweise einfach vorliegt. Beispiele sind: 5-Methyl-4-(1-pyrrolidinyl)-3-[2H]-furanon, 4,5-Dimethyl-3-(1-pyrrolidinyl)-2-[5H]-furanon, 4-Methyl-3-(1-pyrrolidinyl)-2-[5H]-furanon.

20

Icilin ist in Formel III dargestellt. Mit umfaßt sind auch Icilin-Derivate, welche TRPM8 aktivieren. Dies lässt sich gemäß der Ausführungsbeispiele unschwer testen.

25 Allen genannten Stoffen gemeinsam ist, dass sie Kälteempfinden bei Kontakt mit Haut oder Schleimhäuten auflösen.

Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann mit üblichen Hilfs- und Trägerstoffen in fachüblicher Weise galenisch hergerichtet werden, vorzugsweise zur Injektion, i.v., i.p. oder i.m., oder Infusion. Die Dosis liegt vorzugsweise im Bereich von 0,1 bis 5000 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise 1 bis 100 mg/kg Körpergewicht, bezogen

auf einen Tag, eingestellt ist, aufteilbar in 1 bis 10 Gabeeinheiten. Es ist zweckmäßig, die Zusammensetzung zur kontinuierlichen oder diskontinuierlich periodischen Gabe über einen Zeitraum von zumindest 2 Wochen, vorzugsweise 5 zumindest 8 Wochen, höchstvorzugsweise zumindest 20 Wochen, herzurichten. Hiermit verbunden ist ein Behandlungsplan, welcher die andauernde Gabe in diesen Zeiträumen vorsieht. Eine diskontinuierliche periodische Gabe erfolgt dadurch, dass in definierten Zeitperioden einmalige Gabe 10 erfolgen. Die Zeiträume können beispielsweise im Bereich von 1 Stunde bis 7 Tage liegen. Eine kontinuierliche Gabe erfolgt mit geeigneten Systemen, welche eine kontinuierlich Freisetzung der Substanz bewirken. In Frage kommen beispielsweise an bzw. in polymere Mikropartikel adsorbierte 15 therapeutische Substanzen, wobei die Substanzen langsam aus den injizierten Mikropartikeln freigesetzten werden. Solche Systeme sind in umfangreichen Varianten dem Durchschnittsfachmann bekannt. Zu den kontinuierlich Wirkstoffe abgebenden Systemen gehören auch transdermale Systeme, 20 welche dem Durchschnittsfachmann ebenfall in umfangreichen Varianten bekannt sind.

Die Erfindung lehrt schließlich auch ein Verfahren zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere Prostata- 25 krebs, wobei einem erkrankten Patienten eine physiologisch wirksame Dosis einer TRPM8 hemmenden Substanz, dargereicht wird.

Im Rahmen der Erfindung ist es möglich, die erfindungsge- 30 mäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen in Verbindung mit lokaler Hypothermie einzusetzen, wobei die zu behandelnden Gewebe vorzugsweise auf eine Temperatur unterhalb 36 °C, insbesondere unterhalb 30 °C, vorzugsweise unterhalb 25 °C,

gekühlt werden. Die Hypothermie kann kontinuierlich oder diskontinuierlich erfolgen. Im Falle der diskontinuierlichen Hypothermie kann diese vor während und/oder nach der Gabe der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung erfolgen.

Definitionen.

- 10 Im Rahmen dieser Beschreibung wird die Bezeichnung TRPM8 für alle humanen Isoformen, bekannt oder neu, auf Aminosäurenbasis, verwendet. Im Rahmen dieser Beschreibung wird TRPM8 auch Trpp8 genannt. Insbesondere sind die durch die in den Sequenzprotokollen offenbarten Nukleinsäuren codierten Proteine und Peptide sowie die in den Sequenzprotokollen offenbarten Proteine bzw. Peptide umfaßt, ebenso wie die in den angegebenen Literaturstellen offenbarten TRPM8 Sequenzen bzw. die dadurch codierten Proteine oder Peptide. Mit diesem Begriff mit umfaßt sind auch die 15 im Rahmen dieser Beschreibung offenbarten kurzen Sequenzen, welche aus den Isoformen stammen, beispielsweise Immunisierungssequenzen. Weiterhin mit umfaßt sind auch Homologe, wobei die Homologie zumindest 80%, vorzugsweise mehr als 90%, höchstvorzugsweise mehr als 95%, beträgt,
- 20 im Rahmen dieser Beschreibung offenbarten kurzen Sequenzen, welche aus den Isoformen stammen, beispielsweise Immunisierungssequenzen. Weiterhin mit umfaßt sind auch Homologe, wobei die Homologie zumindest 80%, vorzugsweise mehr als 90%, höchstvorzugsweise mehr als 95%, beträgt,
- 25 und zwar berechnet gemäß dem Programm BLAST in der am Anmeldetag aktuellen Fassung. Weiterhin sind Sequenzen umfaßt, welche lediglich Teilsequenzen der explizit offenbarten Sequenzen, beispielsweise ein Exon oder mehrere Exons, oder komplementärer Sequenzen hierzu darstellen,
- 30 mit der Maßgabe, daß diese mit zumindest gleicher Affinität an ein protein- oder peptidspezifisches Zielmolekül, insbesondere die erfindungsgemäß verwendeten Substanzen, binden.

Im Zusammenhang mit erfindungsgemäßen Verwendungen umfassen die Begriffe der Proteine bzw. Peptide neben den Volllängen der offebarten Sequenzen (siehe auch vorstehender Absatz) auch Teilsequenzen hieraus, und zwar mit einer Mindestlänge von 4 Aminosäuren, vorzugsweise 10 bis 30 Aminosäuren.

Der Begriff der Behandlung umfaßt auch die Prophylaxe.

10

Eine Tumorzelle überexprimiert TRPM8, wenn die Menge gebildeter TRPM8 RNA oder gebildeten TRPM8 Proteins in einer Tumorzelle höher ist als in Normalzellen gleichen Gewebetyps, vorzugsweise vom gleichen Patienten herrührend. Es versteht sich, dass für den Vergleich Tumor/Normal die gleichen Messverfahren verwendet werden. Dem Fachmann sind verschiedene Messverfahren zur Bestimmung von Nukleinsäuren und/oder Proteinen bzw. Peptiden in Zellen bekannt, welche alle anwendbar sind.

20

Als Aktivator ist eine Verbindung oder Substanz bezeichnet, welche entweder die Bildung von TRPM8 fördert oder die Aktivität von gebildetem TRPM8 erhöht, bezogen auf die TRPM8 Aktivität in Abwesenheit des Aktivators. Insofern kann ein Aktivator einerseits eine Substanz sein, welche in der Entstehungskaskade von TRPM8 aktivierend eingreift. Auf der anderen Seite kann ein Aktivator eine Substanz sein, welche mit gebildetem TRPM8 eine Bindung eingeht, und zwar dergestalt, dass weitere physiologische Wechselwirkungen mit endogenen Substanzen erhöht sind, verglichen mit den gleichen Wechselwirkungen, jedoch ohne Bindung des Aktivators. Ein Aktivator erhöht vorzugsweise bei Kontakt mit TRPM8 exprimierenden Zellen erhöht den Transport von

Ionen in eine Zelle hinein oder daraus heraus gegenüber einer Zelle mit gleichem TRPM8 Expressionsniveau, jedoch ohne Kontaktierung mit den Aktivator. Der Ionentransport lässt sich beispielsweise gemäß der Literaturstelle Peier et al., Cell 108(5):705-715 (2002) bestimmen.

Die galenische Herrichtung einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung kann in fachüblicher Weise erfolgen. Als Gegenionen für ionische Verbindungen kommen beispielsweise Na^+ , K^+ , Li^+ oder Cyclohexylammonium infrage. Geeigente feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Dragees, Tabletten, (Mikro-) Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Säfte, Suspensionen, Emulsionen, Tropfen oder injizierbare Lösungen (i.v., i.p., i.m.) sowie Präparate mit protrahierter Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung übliche Hilfsmittel wie Trägerstoffe, Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel und Lösungsvermittler, Verwendung finden. Als Hilfsstoffe sei Magnesiumcarbonat, Titandioxyd, Lactose, Mannit und andere Zucker, Talcum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Zellulose und ihre Derivate, tierische und pflanzliche Öle wie Lebertran, Sonnenblumen-, Erdnuss- oder Sesamöl, Polyethylenglycole und Lösungsmittel, wie etwa steriles Wasser und ein- oder mehrwertige Alkohole, beispielsweise Glycerin, genannt. Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung ist dadurch herstellbar, dass mindestens ein erfindungsgemäß verwendeter TRPM8 Aktivator in definierter Dosis mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Träger und ggf. weiteren geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen mit definierter Dosis gemischt und zu der gewünschten Darreichungsform hergerichtet ist.

Im Rahmen der vorstehenden Definition gegenüber dem engen Wortsinn erweiterte Begriffsbestimmungen umfassen auch die bestimmten Begriffe im engen Wortsinn. Ausführungen zu 5 einer Anspruchskategorie sowie zu einem selbstständigen Anspruch abhängige Ansprüche gelten entsprechend auch für Ansprüche anderer Kategorie.

10 Ausführungsbeispiele:

Beispiel 1: Verringerung der Koloniebildungsrate.

HEK293 Zellen wurden nicht transfiziert, mit TRPM8 transfiziert oder mit einem Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden in einem Soft Agar Assay (siehe Literaturstelle Shappel et al., Cancer Research 61:497-503 (2001)) eingesetzt. Die stark vereinzelt ausplattierten und im Agar immobilisierten Zellen wachsen dabei dreidimensional und 20 substratunabhängig. Die Koloniebildungsrate erlaubt Rückschlüsse auf die Tumorgenität der Zellen. Je 1000 Zellen wurden in der 6-Lochplatte in 2 ml Softagar-haltigem Medium ausplattiert und nach Erstarren des Agars mit 1 ml Medium (DMEM mit 10% FKS, 2mM Glutamin) überschichtet. Men-25 thol, gelöst in Ethanol, wurde dem Medium in Endkonzentrationen von 10, 100 und 1000 µM zugegeben und jeden fünften Tag substituiert. Als Kontrolle wurde lediglich das Lösungsmittel zugegeben. Nach drei Wochen wurden die Anzahl der gebildeten Kolonien unter dem Mikroskop bestimmt. Die 30 TRPM8 transfizierten Zellen zeigen deutlich geringere Koloniebildung als die Wildtyp Zellen und die mit dem Leervektor transfizierten Zellen.

Beispiel 2: Tumorwachstum in Nacktmäusen.

Humane TRPM8 cDNA wurde in den Expressionsvektor pcDNA3.1
5 subkloniert und anschließend stabil in HEK293 Zellen
transfiziert. Die Expression von TRPM8 Protein wurde im
Western-Blot mit TRPM8-spezifischen Antikörpern nachgewie-
sen. Für die Untersuchung der Wirkung von Menthol oder
Icillin auf das Tumorwachstum *in vivo* wurden je 2 Millionen
10 HEK293-TRPM8 Zellen in männliche Nacktmäuse subkutan inji-
ziert oder in der Prostata xenotransplantiert. Die Ver-
suchsgruppen bestanden aus jeweils 10 Tieren. Die Kon-
trollgruppen wurden nicht bzw. nur mit DMSO behandelt.
Behandelt wurden die Tiere durch tägliche intraperitoneale
15 Applikation von 30 mg/kg Körpergewicht Icillin oder Men-
thol, gelöst in DMSO, über einen Zeitraum von drei Wochen.
Das Wachstum der subkutan injizierten Zellen wurde über
die gesamte Versuchsdauer zweimal wöchentlich vermessen.
Unmittelbar nach Beendigung der Versuche wurden die Xe-
20 notranplantate resektiert, gewogen und asserviert. Im Er-
gebnis zeigten die behandelten Tiere ein deutlich geringe-
res Tumorwachstum als die nicht behandelten Kontrolltiere.

25 Beispiel 3: TRPM8 Sequenzen

In den Sequenzprotokollen sind TRPM8 Sequenzen, insbeson-
dere Splice Varianten angegeben. Im Falle der Nukleinsäu-
resequenzen kodieren diese für Proteine, Peptide oder
30 Teilsequenzen von Proteinen oder Peptiden, die im Rahmen
der Erfindung aktivierbar sind. Im Falle der Aminosäuren-
sequenzen handelt es sich um im Rahmen der Erfindung akti-
vierbare Proteine, Peptide oder Teilsequenzen von

Proteinen oder Peptiden. Weitere Sequenzen für TRPM8 sind der eingangs genannten Literatur zu entnehmen.

5

10

15

20

25

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ergänzung Seite 2 Hintergrund der Erfindung

Neuroendokrine Tumoren (NET), die früher auch als Karzinoidtumoren bezeichnet wurden, sind potentiell maligne Tumoren, die sich aus hormonproduzierenden (endokrinen) Zellen entwickeln. NET des Gastrointestinaltraktes werden auch als Gastro-Entero-Pankreatische (GEP) bezeichnet. Auch in Organen der Atemwege z.B. den Bronchien oder der Lunge können NET entstehen. Über die Kalzium-Homöostase dieser seltenen Krebserkrankungen insbesondere die Rolle von TRP Kanälen in NET ist wenig bekannt.

Ergänzung Seite 10 Definitionen

Nanosuspension (Nanokristalle in wässriger Lösung kleiner als 1 µm)

Ergänzung Seite 14 Ansprüche

Verwendung nach Anspruch 1 wobei die Tumorerkrankung neuroendokrine Tumoren insbesondere des Gastrointestinaltraktes und der Atmungsorgane sind.

Ersatz Formeln I-III durch neue Zeichnungen

Ergänzung Ausführungsbeispiele

Aus Beispiel 1 Verringerung der Koloniebildungsrate wird Beispiel 5

Aus Beispiel 2 Tumorwachstum in Nacktmausen wird Beispiel 6

Aus Beispiel 3: TRPM8 Sequenzen wird Beispiel 10

Beispiel 1: Iciliin induziert Zytotoxizität in TRPM8 Transfektanden

HEK293 Zellen wurden mit TRPM8 stabil transfiziert (K52) bzw. mit Leervektor stabil transfiziert (M2). Je 5000 Zellen wurden in 96well Platten in 100µl Medium ausplattiert und am nächsten Tag mit Iciliin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 30µM, 10µM, 3µM versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (K0) sowie Zellen die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Iciliin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 48h Inkubation wurden die Zellen unter dem Mikroskop fotografiert. Es zeigte sich ein deutlicher konzentrationsabhängiger zytotoxischer Effekt von Iciliin auf HEK293 TRPM8 Transfektanden, aber nicht auf Kontrollzellen. Die Zytotoxizität korreliert

mit einer dramatischen Änderung der Zellmorphologie. Zellmorphologie DMSO hatte keinen Einfluß auf Zellwachstum oder Zellmorphologie.

Beispiel 2: Iciliin wirkt anti-proliferatorisch auf TRPM8 Transfektanden

HEK293 Zellen wurden mit TRPM8 stabil transfiziert (K52) bzw. mit Leervektor stabil transfiziert (M2). Je 5000 Zellen wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100 μ l Medium ausplattiert und am nächsten Tag mit Iciliin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M und 100nM versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (K0) sowie Zellen die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Iciliin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 48h Inkubation wurde die Zellproliferation durch luminometrische Quantifizierung der intrazellulären ATP Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die relativen Lichteinheiten (RLU) im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Iciliin bewirkt in TRPM8 positiven Zellen eine deutliche konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation, während keine Effekt auf Kontrollzellen zu beobachten war. Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Proliferationsassays z.B MTS, MTT, XTT beobachtet.

Beispiel 3: Iciliin wirkt pro-apoptotisch auf TRPM8 Transfektanden

HEK293 Zellen wurden mit TRPM8 stabil transfiziert (K52) bzw. mit Leervektor stabil transfiziert (M2). Je 5000 Zellen wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100 μ l Medium ausplattiert und am nächsten Tag mit Iciliin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M und 100nM versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (K0) sowie Zellen die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Iciliin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 24h Inkubation wurde die Apoptoseinduktion durch fluorometrische Quantifizierung Caspase3/7 Aktivität bestimmt. Dargestellt sind die relativen Lichteinheiten (RLU) im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Iciliin bewirkt in TRPM8 positiven Zellen eine deutliche konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion, während keine Effekt auf Kontrollzellen zu beobachten war. Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Apoptoseassays z.B PARP-Western Blot gemacht.

Beispiel 4: Iciliin wirkt anti-proliferatorisch auf LNCaP Zellen

Je 8000 Zellen der Prostatatumorzelllinie LNCaP wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100 μ l Medium ausplattiert und am nächsten Tag mit Iciliin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 30 μ M und 3 μ M versetzt. Ferner wurden Paclitaxel (Pax) in einer Konzentration von 10nM und in Kombination mit Iciliin in den vorher genannten Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrolle wurden Zellen, die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Iciliin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 48h Inkubation wurde die Zellproliferation durch luminometrische Quantifizierung der intrazellulären ATP Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die relativen Lichteinheiten (RLU) im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Iciliin bewirkt in

LNCaP Zellen, die TRPM8 endogen exprimieren, eine deutliche konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation, während keine Effekt auf Kontrollzellen zu beobachten war. Auch Paclitaxel wirkt proliferationsinhibierend. Die Kombination von Iciliin mit Paclitaxel wirkt stärker proliferationsinhibierend als beide Substanzen allein (Synergismuseffekt). Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Proliferationsassays z.B MTS, MTT, XTT beobachtet.

Beispiel 5: Iciliin bewirkt eine Verringerung der Koloniebildungsrate

TRPM8 stabil transfizierte HEK293 Zellen (K51, K52) wurden in Softagar immobilisiert. Als Maß für das substratunabhängige Wachstum wurde die Koloniebildungsrate bestimmt. In 2ml Medium in der 6-Loch Platte wurden 1000 Zellen ausplattiert. Die Zugabe von Iciliin in den Endkonzentrationen 1µM und 100µM sowie die Lösungsmittelkontrolle DMSO (Ko) entsprechend der höchsten Iciliin-Konzentration wurde nach jeweils 48h im Überstand substituiert. Der Überstand (2ml) wurde jeweils nach 96h ausgetauscht. Nach insgesamt 14 Tagen wurden die im Agar gewachsenen Kolonien mit Neutralrot angefärbt, auf Zellstoff getrocknet und fotografiert. Die Zugabe von Iciliin bewirkt eine deutliche konzentrationsabhängige Inhibition der Anzahl lebender Kolonien.

Beispiel 6: Iciliin reduziert Tumorwachstum in Nacktmausen

TRPM8 stabil transfizierte HEK293 Zellen (K52) wurden intra-peritoneal (i.p.) in Nacktmausen xenotransplantiert (NMRI-nu/nu, 9 Wochen alt, männlich, 2 Millionen Zellen pro Tier). Die Tiere wurden jeden 3. Tag über einen Zeitraum von 14 Tagen mit 20µl einer 100mM Iciliin-Lösung in DMSO i.p. behandelt. Die Kontrollgruppe wurde unter selben Bedingungen nur mit DMSO behandelt. Das Tumorwachstum wurde durch tägliche Bestimmung des Körpergewichtes verfolgt. Die Iciliinbehandlung bewirkte ein deutlich reduziertes Tumorwachstum im Vergleich zur Lösungsmittel-behandelten Kontrollgruppe.

Beispiel 7: TRPM8 ist in neuroendokrinen Tumoren exprimiert

A) Aus einem Lungenadenokarzinom sowie zwei Lungentumoren mit neuroendokriner Differenzierung wurde Tumor -und korrespondierendes Normalepithelgewebe herausgeschnitten. Die mRNA wurde präpariert und die TRPM8 Expression durch RT-PCR Analyse quantifiziert. Gezeigt ist die relative Expression von Tumor- versus Normalepithelgewebe. Die Tumoren mit neuroendokriner Differenzierung zeigen eine deutliche TRPM8 Expression, wohingegen im Adenokarzinom keine relevante TRPM8 Expression vorhanden ist.

B) Aus humanen neuroendokrinen Tumorzelllinien, die aus Pankreaskarzinomen (BON-1, QGP-1) bzw. Kolonkarzinom (LCC-18) stammen, wurde mRNA präpariert und die TRPM8 Expression durch RT-PCR Analyse quantifiziert. Dargestellt ist die relative Expression der mRNA im Vergleich zu TRPM8 positiven LNCaP Prostatatumorzellen. Alle drei getesteten neuroendokrinen Tumorzelllinien exprimieren TRPM8 in signifikanten Mengen.

Beispiel 8: Iciliin wirkt pro-apoptotisch auf neuroendokrine Tumorzellen

Humane neuroendokrine QGP-1 Pankreastumorzellen wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100 μ l Medium ausplattiert (5000 Zellen/well) und am nächsten Tag mit Icilioin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 100nM, 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (Ko) sowie Zellen, die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Icilioin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 24h Inkubation wurde die Apoptoseinduktion durch fluorometrische Quantifizierung Caspase3/7 Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die Apoptoserate im Verhältnis zu Lösungsmittel-behandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Icilioin bewirkt in QGP-1 Zellen eine deutliche konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion, während kaum Effekte bei Kontrollzellen zu beobachten war.

Beispiel 9: Iolin wirkt anti-proliferatorisch auf neuroendokrine Tumorzellen

Humane neuroendokrine QGP-1 Pankreastumorzellen wurden in 96well Platten als 6fach Ansatz in 100 μ l Medium ausplattiert (5000 Zellen/well) und am nächsten Tag mit Icilioin, gelöst in DMSO in den Endkonzentrationen 100nM, 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M versetzt. Als Kontrolle wurden völlig unbehandelte Zellen (Ko) sowie Zellen, die mit DMSO in einer Verdünnung entsprechend der höchsten Icilioin-Konzentration versetzt wurden, mitgeführt. Nach 48h Inkubation wurde die Zellproliferation durch luminometrische Quantifizierung der intrazellulären ATP Konzentration bestimmt. Dargestellt ist die Proliferationsrate im Verhältnis zu Lösungsmittel-behandelten Kontrollzellen. Die Gegenwart von Icilioin bewirkt in QGP-1 Zellen eine konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation, während keine Effekt auf Kontrollzellen zu beobachten war. Ähnliche Ergebnisse wurden mit anderen Proliferationsassays z.B MTS, MTT, XTT beobachtet.

Patentansprüche:

1. Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen, in welchen TRPM8 überexprimiert ist.
- 10 2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Tumorerkrankung Prostatakrebs ist.
- 15 3. Verwendung einer Substanz, vorzugsweise nach Anspruch 1 oder 2, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Menthol, Menthyldeivate, Pyrrolidinyl-Derivate des Furanon, Icillin, Icillin-Derivate und Mischungen dieser Substanzen" zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere zur Behandlung von Prostatakrebs.
- 20 4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Substanz oder die Mischung solcher Substanzen mit üblichen Hilfs- und Trägerstoffen galenisch hergerichtet wird.
- 25 5. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Tumorerkrankungen enthaltend eine TRPM8 aktivierende Substanz und/oder eine Substanz, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Menthol, Menthyldeivate, Pyrrolidinyl-Derivate des Furanon, Icillin,

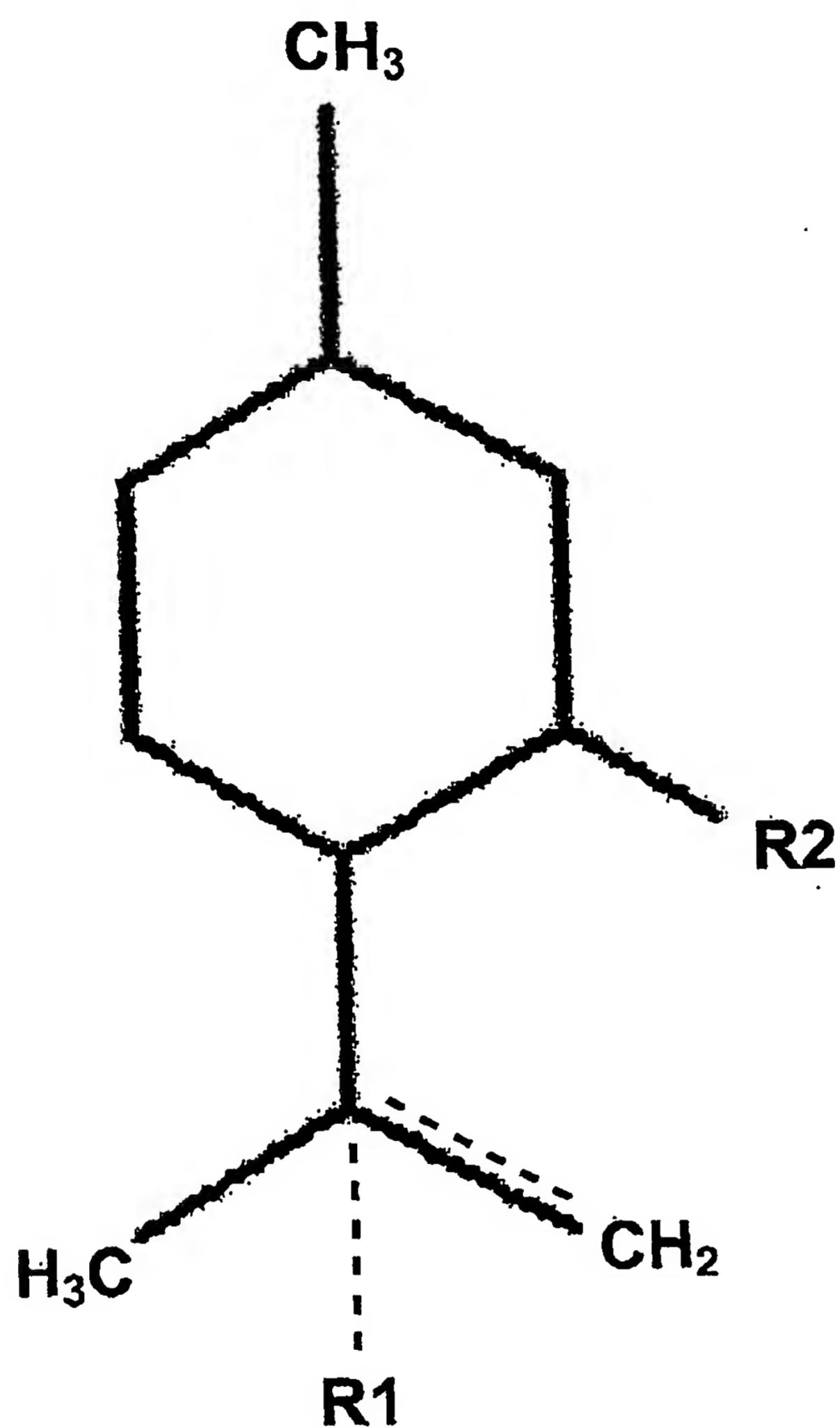
Icillin-Derivate und Mischungen dieser Substanzen" sowie übliche Hilfs- und Trägerstoffe, vorzugsweise galenisch zur Injektion, i.v., i.p. oder i.m., oder Infusion hergerichtet.

5

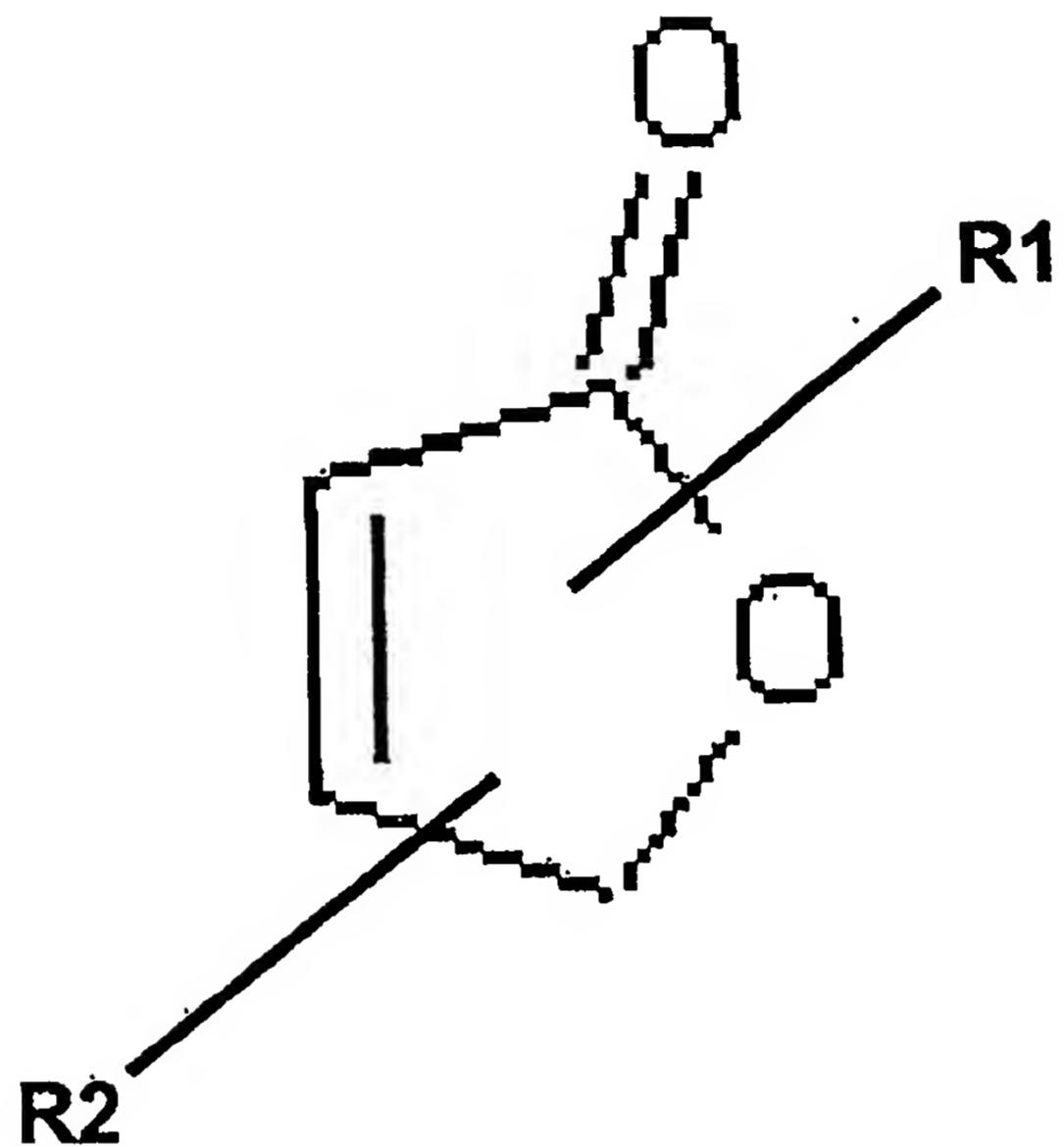
6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei die Dosis im Bereich von 0,1 bis 1000 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise 1 bis 100 mg/kg Körpergewicht, bezogen auf einen Tag, eingestellt ist, aufteilbar in 1 bis 10 Gabeeinheiten.
10
 7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5 oder 6, wobei die Zusammensetzung zur kontinuierlichen oder diskontinuierlich periodischen Gabe über einen Zeitraum von zumindest 2 Wochen, vorzugsweise zumindest 8 Wochen, hergerichtet ist.
15
- 20
8. Verfahren zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere Prostatakrebs, wobei einem erkrankten Patienten eine physiologisch wirksame Dosis einer TRPM8 hemmenden Substanz, insbesondere eine pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dargereicht wird.
25

30

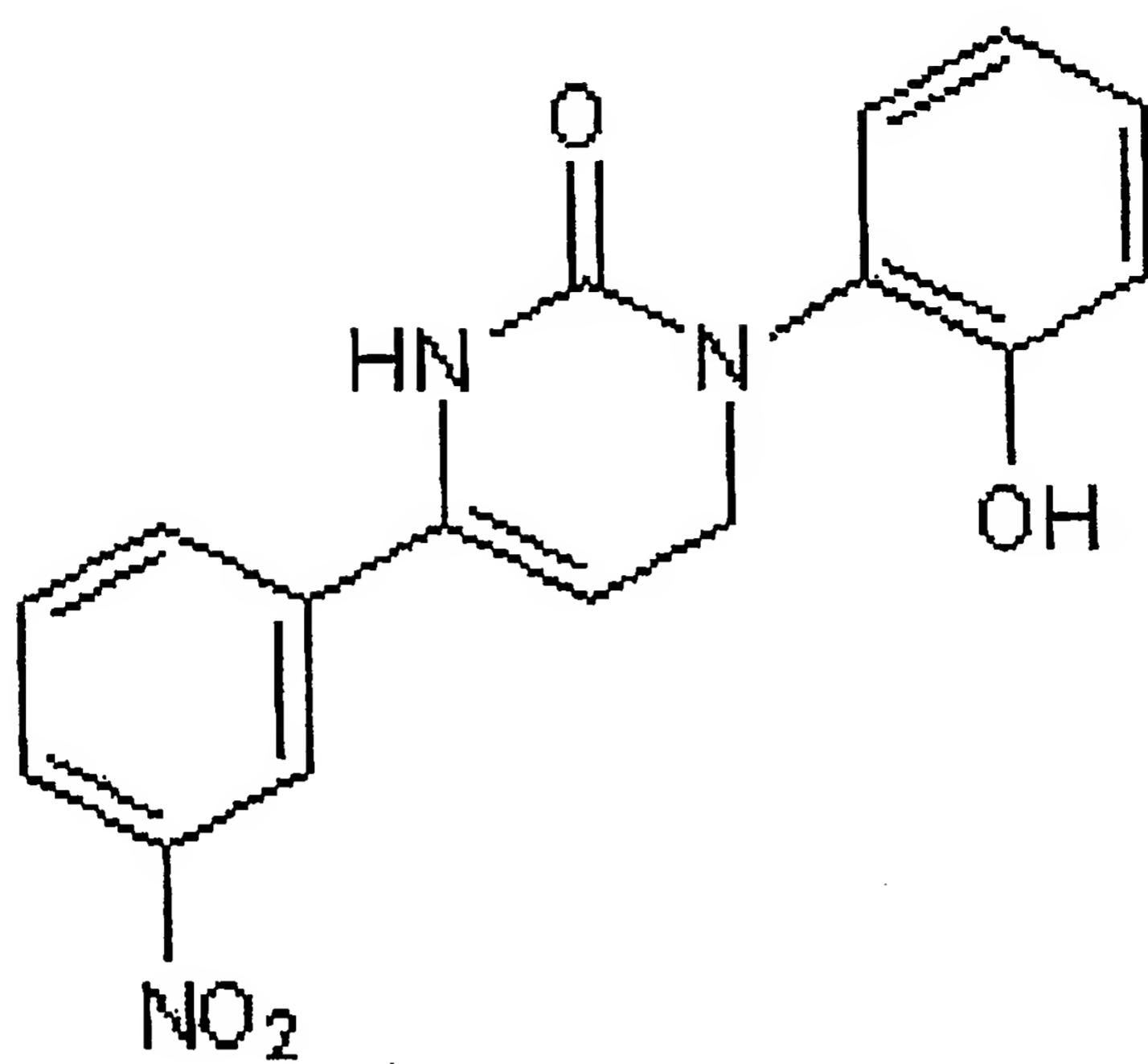
10/539874



Formel I
Fig. 1



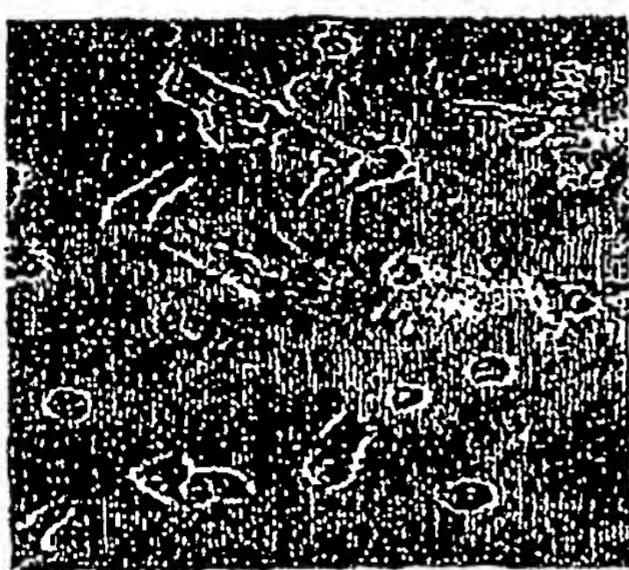
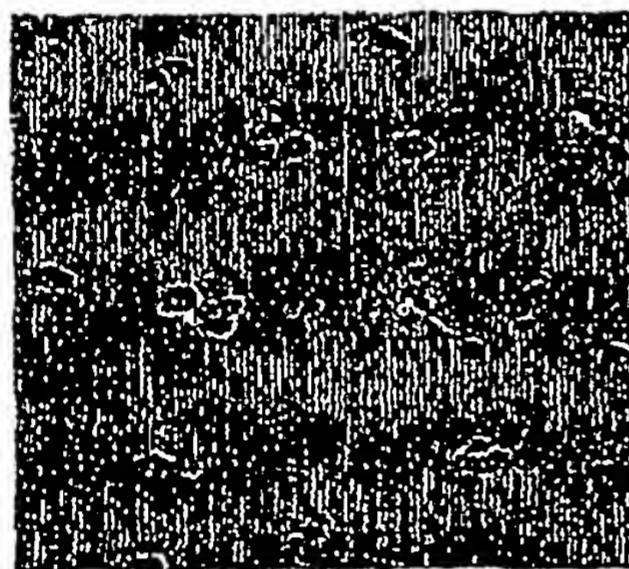
Formel II
Fig. 2



Formel III
Fig. 3

K52

M2

3 μ M10 μ M30 μ M

DMSO



Ko

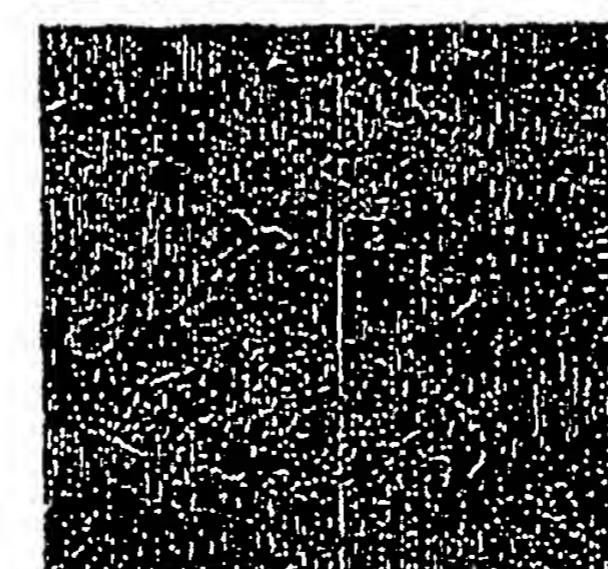
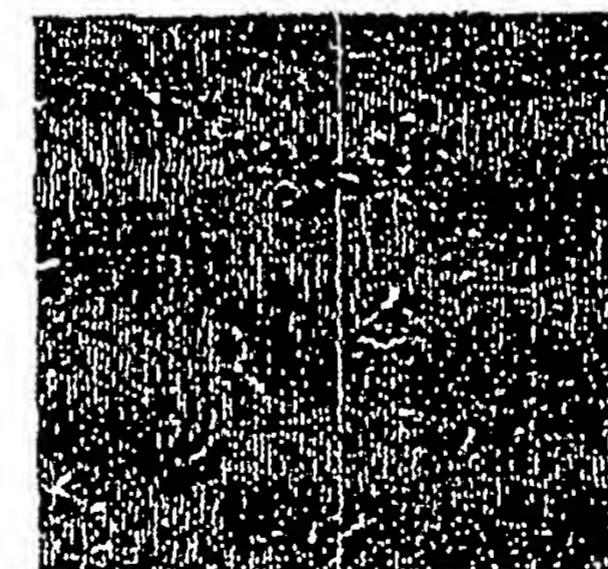
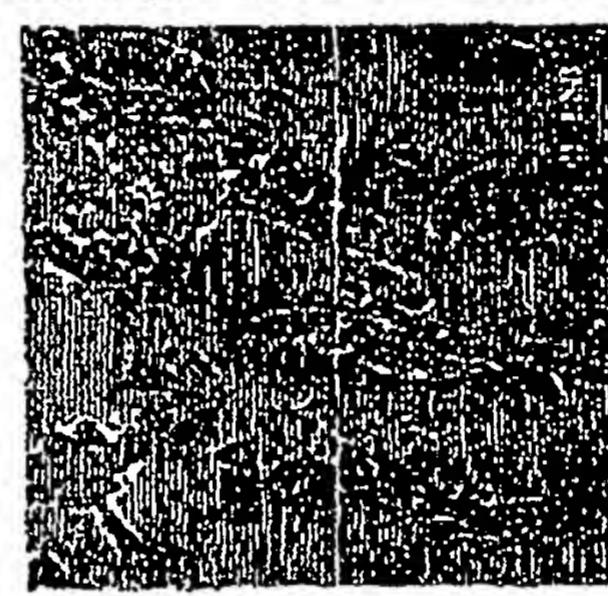
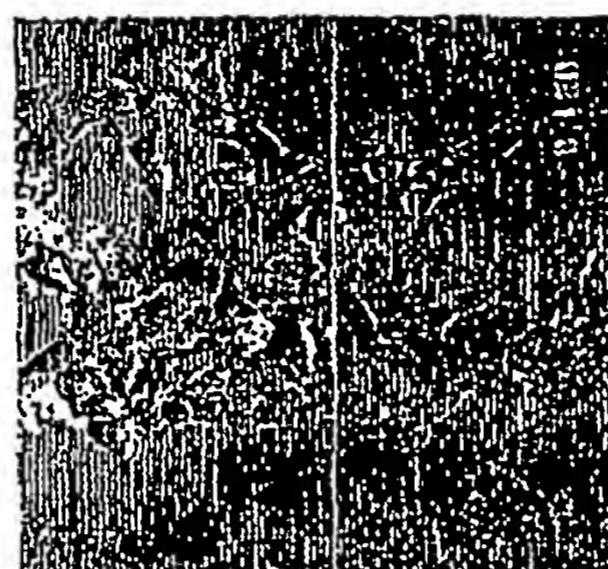
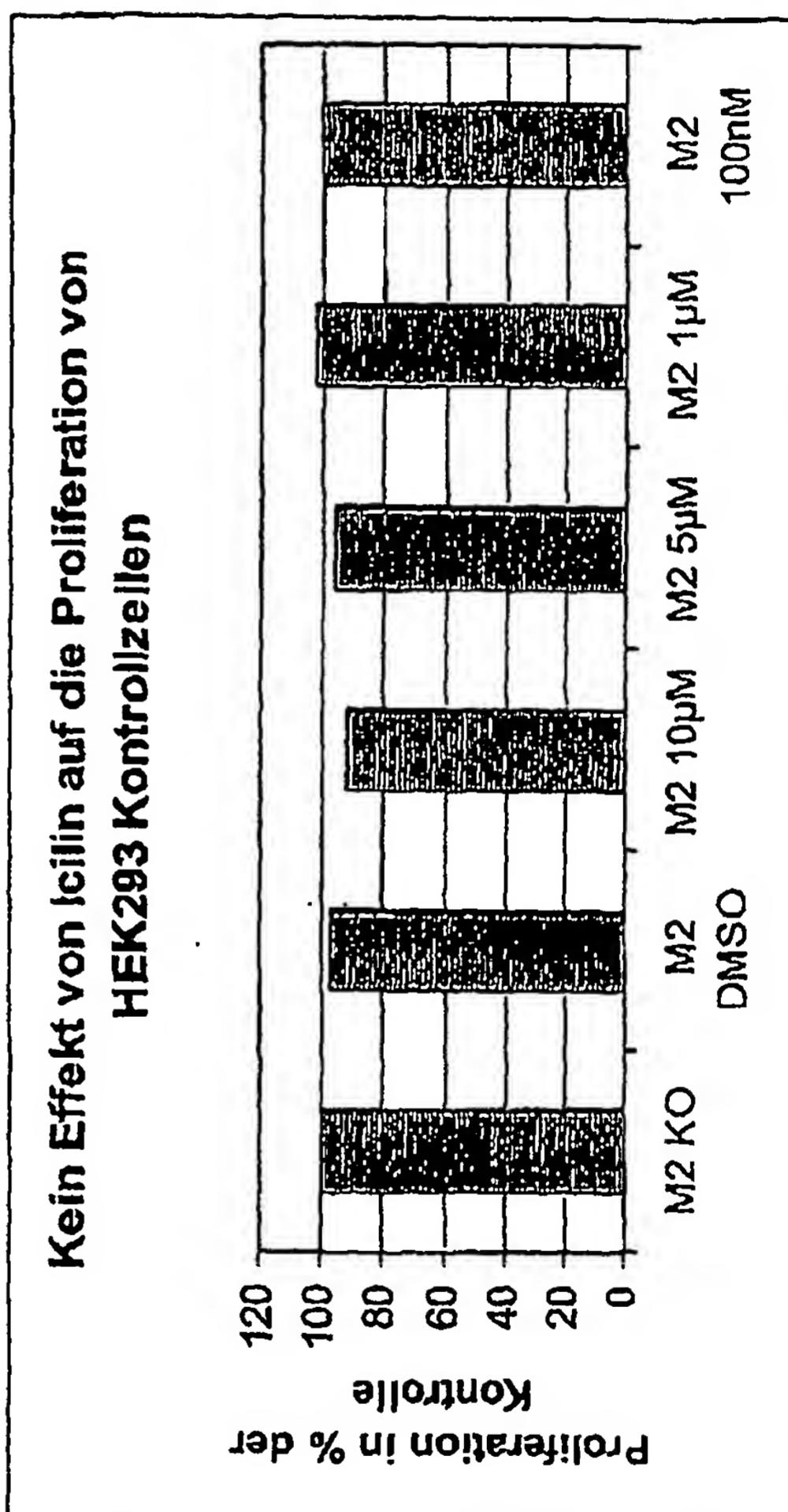
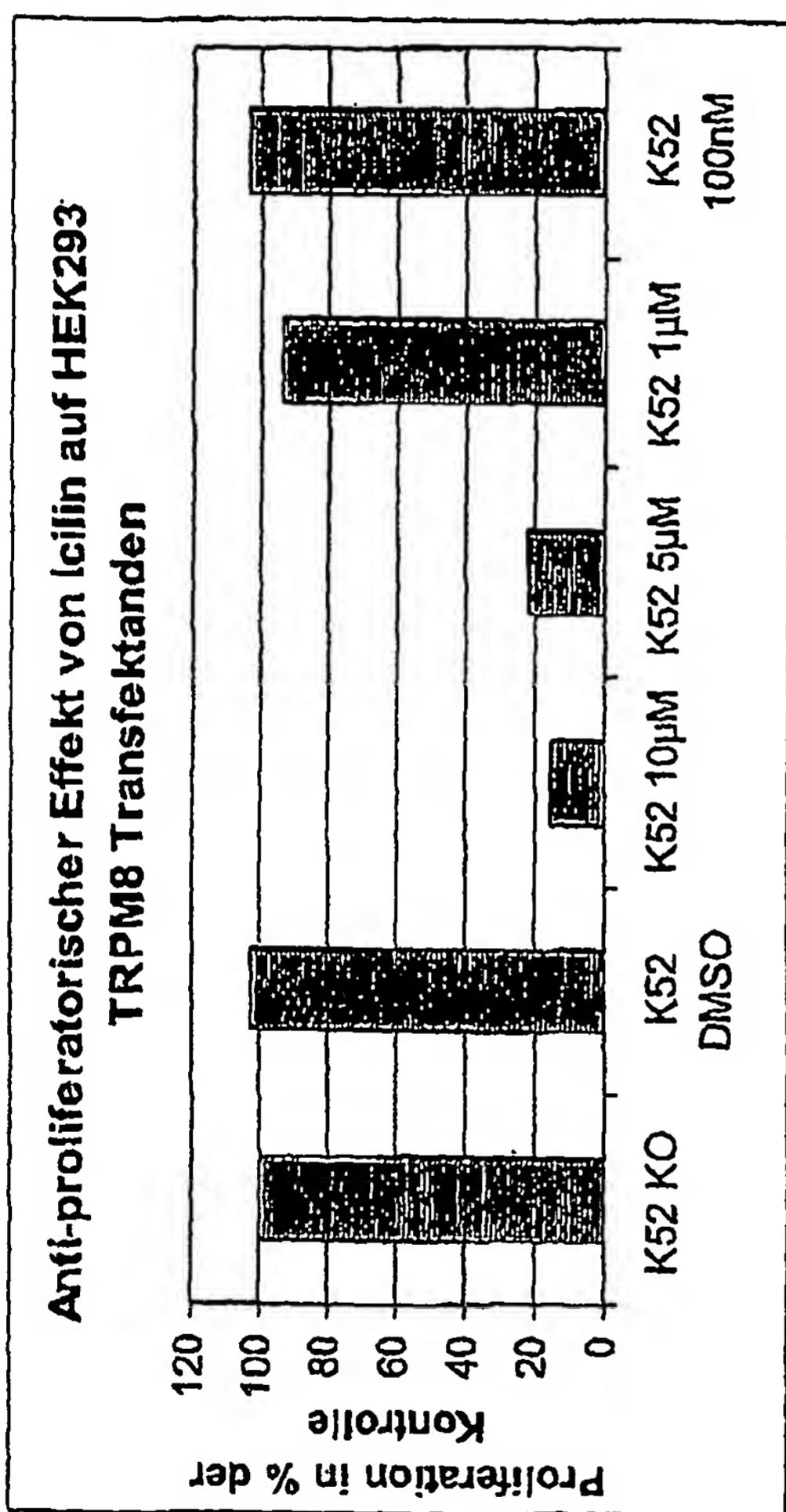


Fig. 4

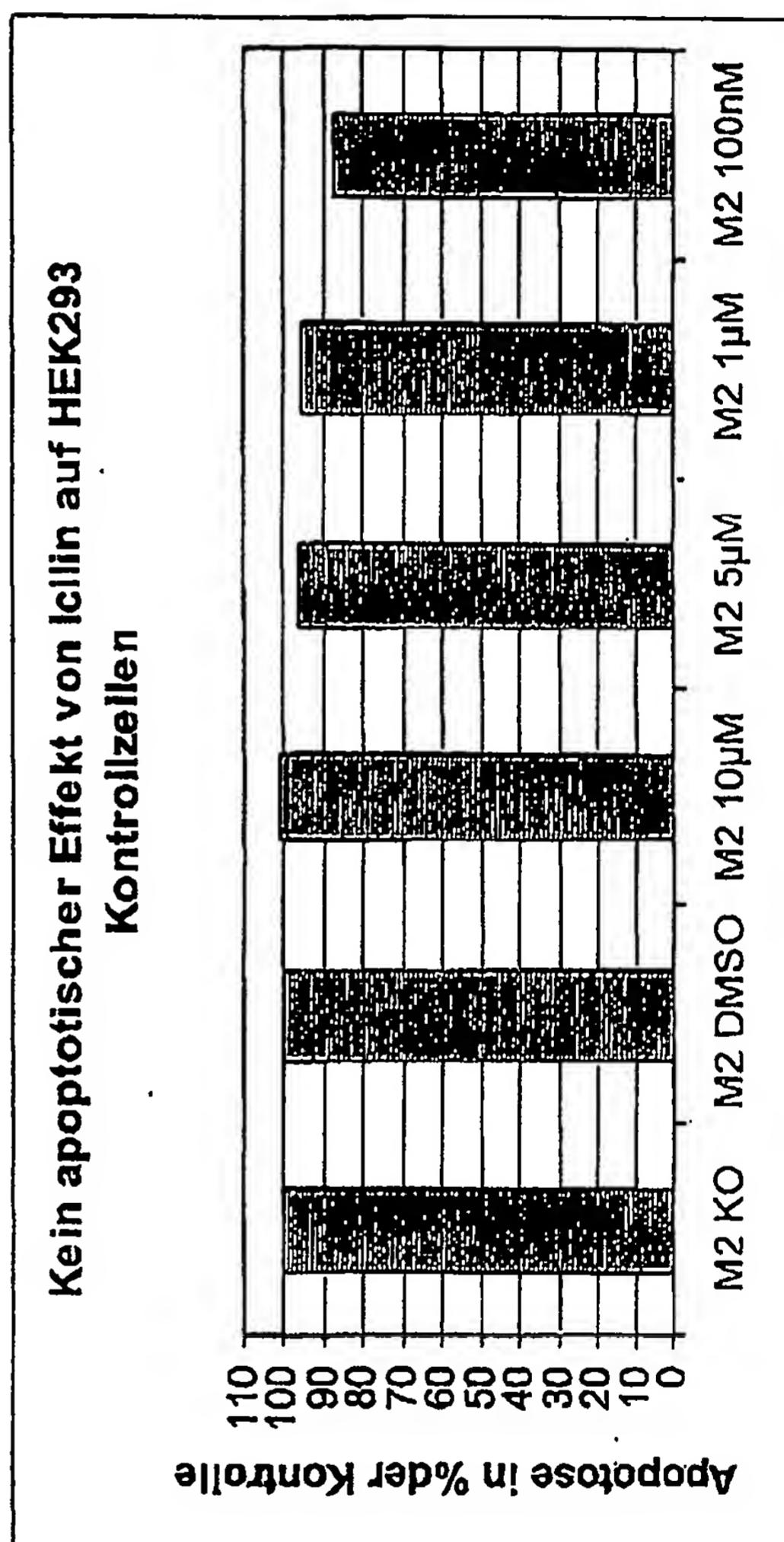
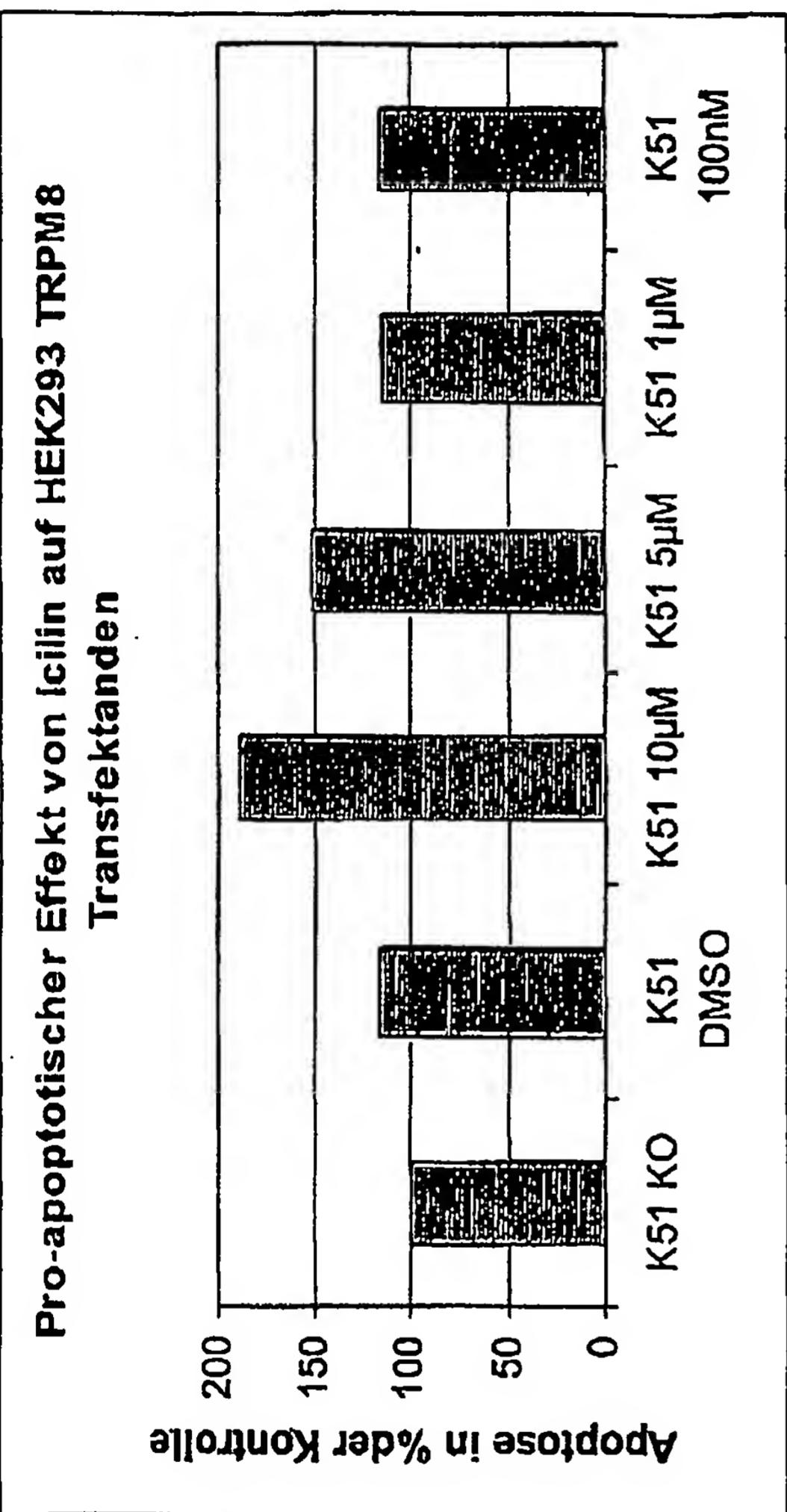
Beispiel 1

Fig. 5

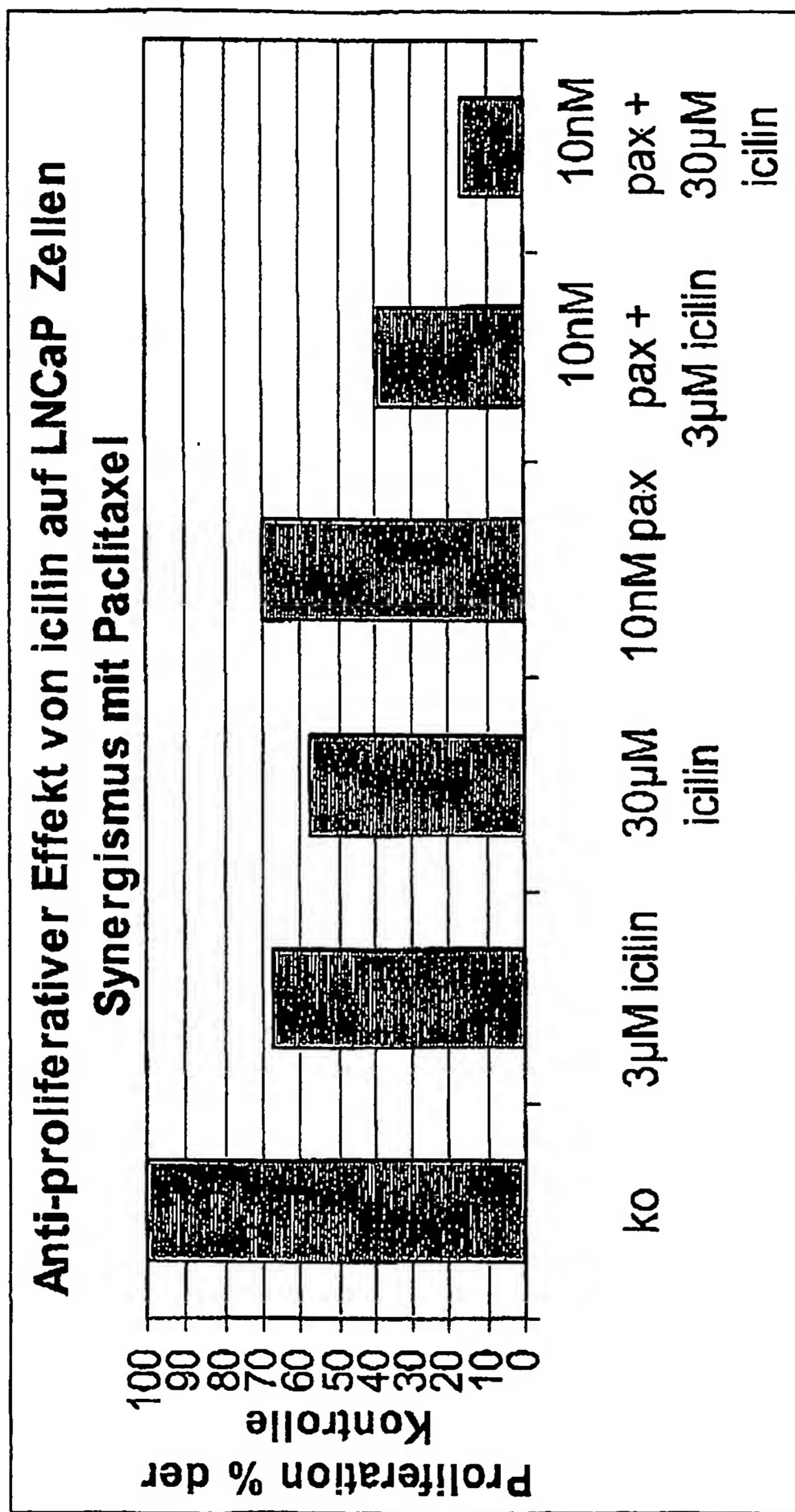


Beispiel 2

Fig 6

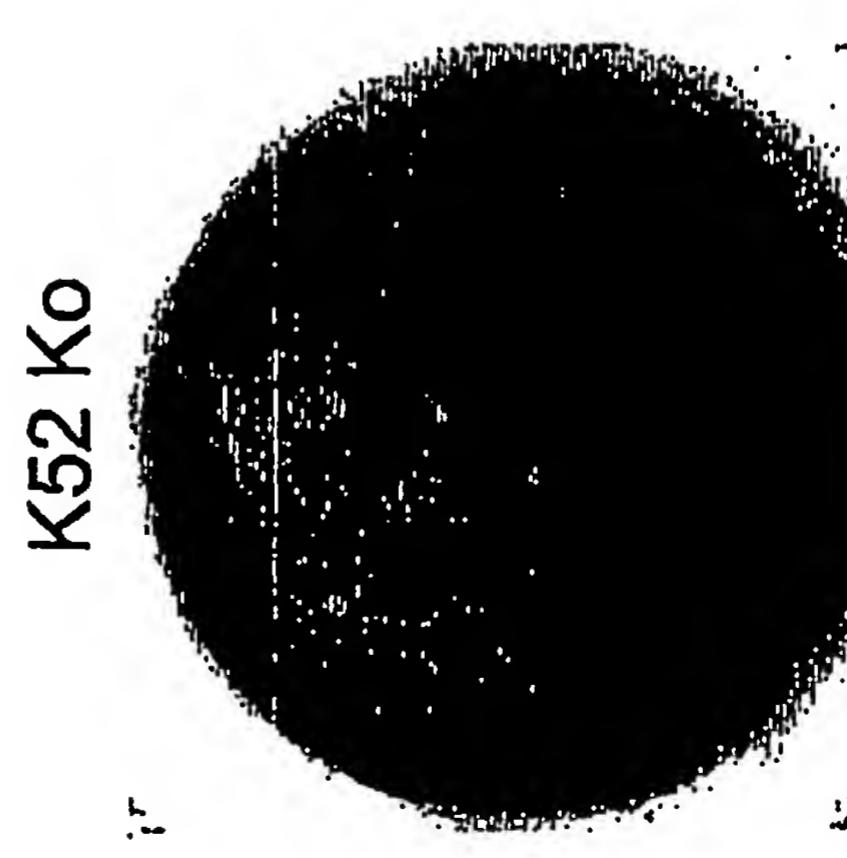
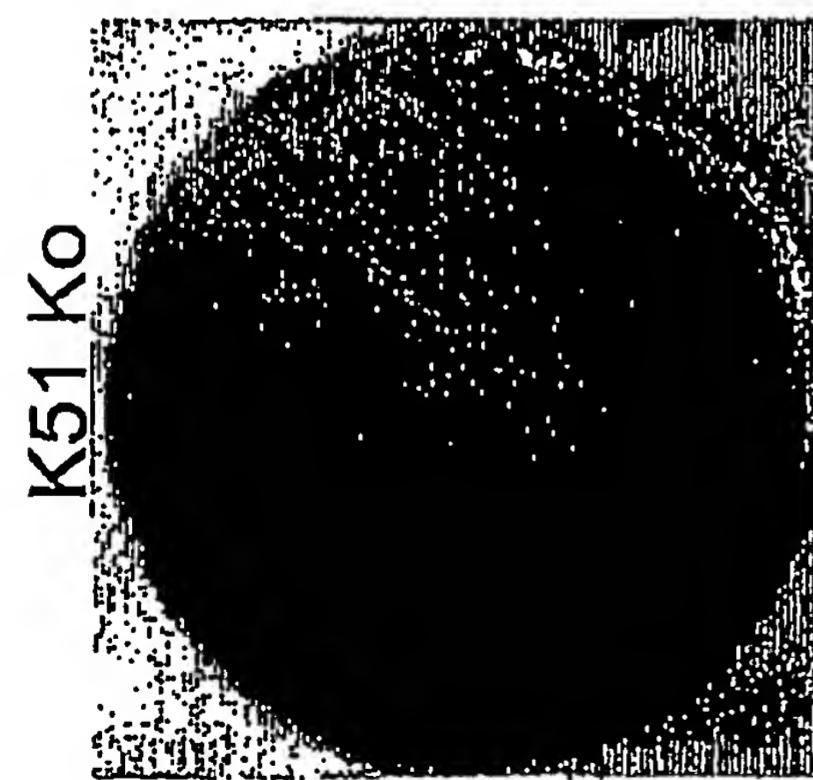
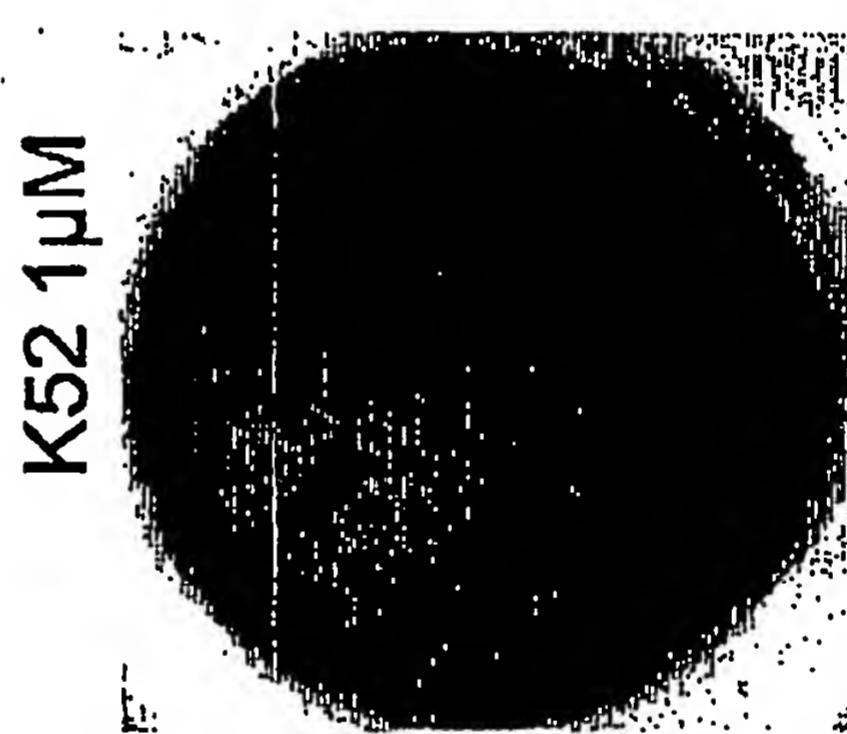
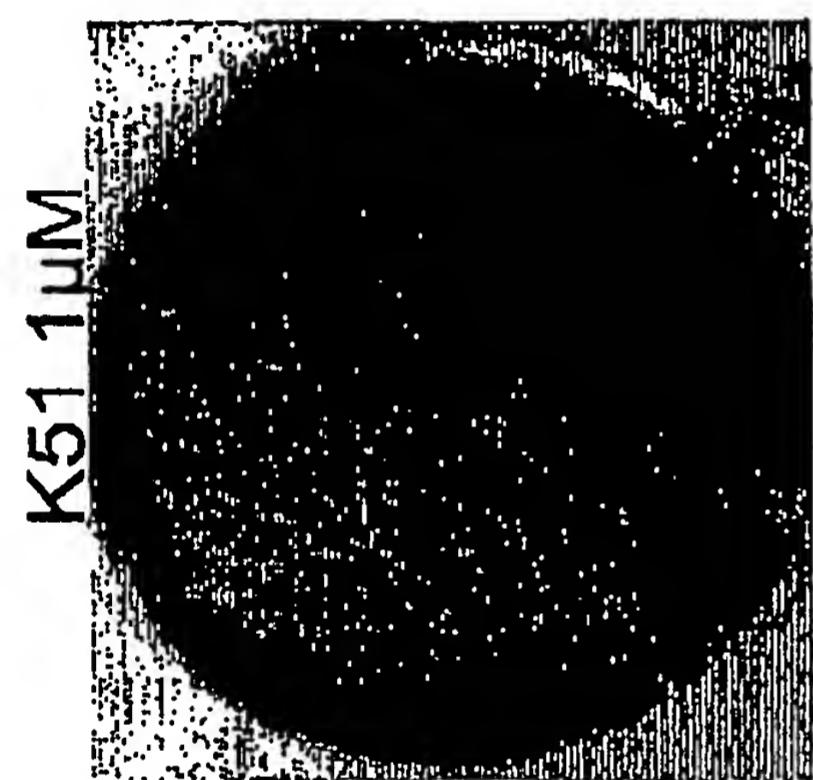
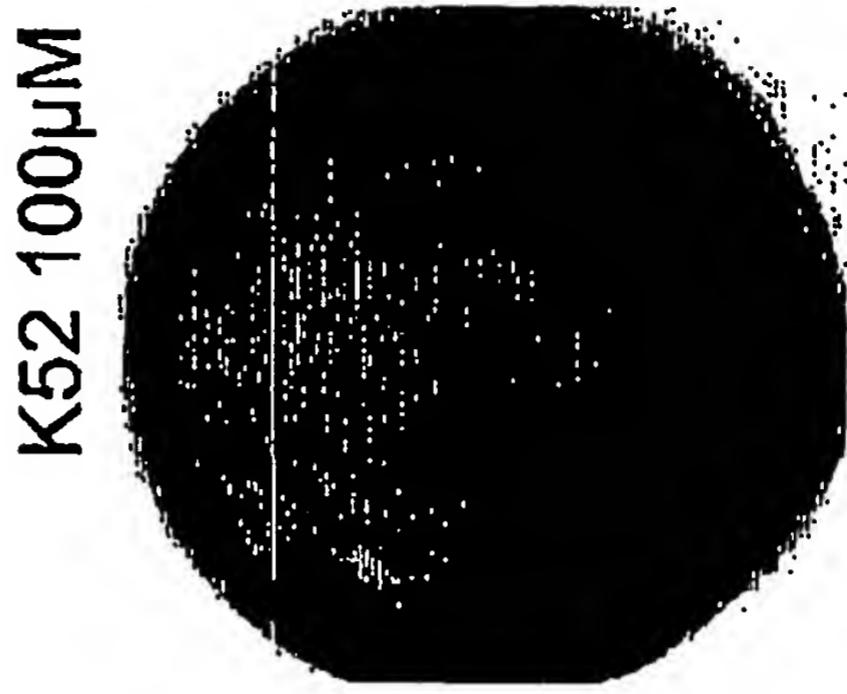
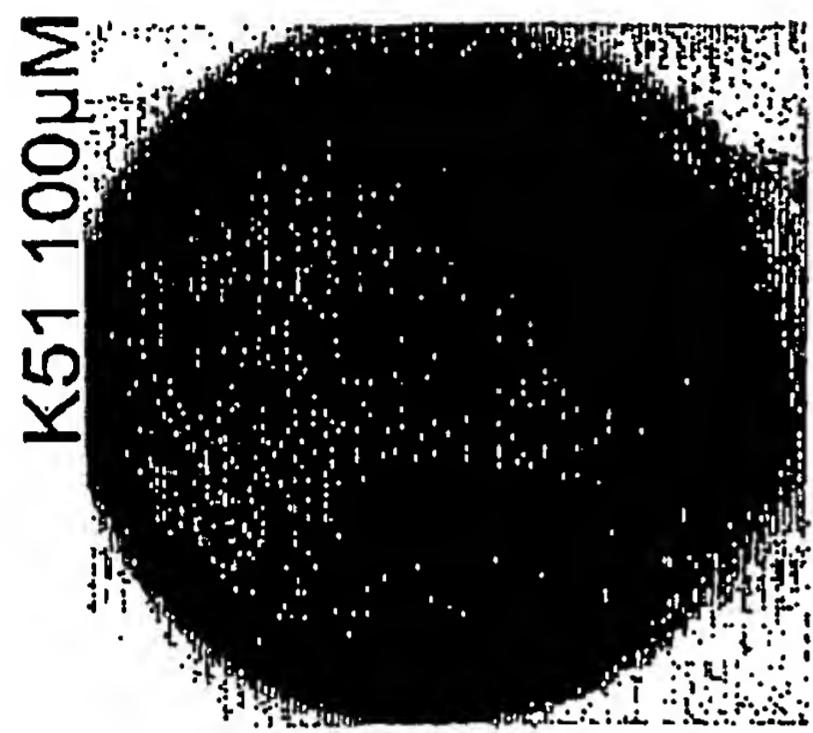


Beispiel 3



Beispiel 4

Fig. 7



Beispiel 5

Fig. 8

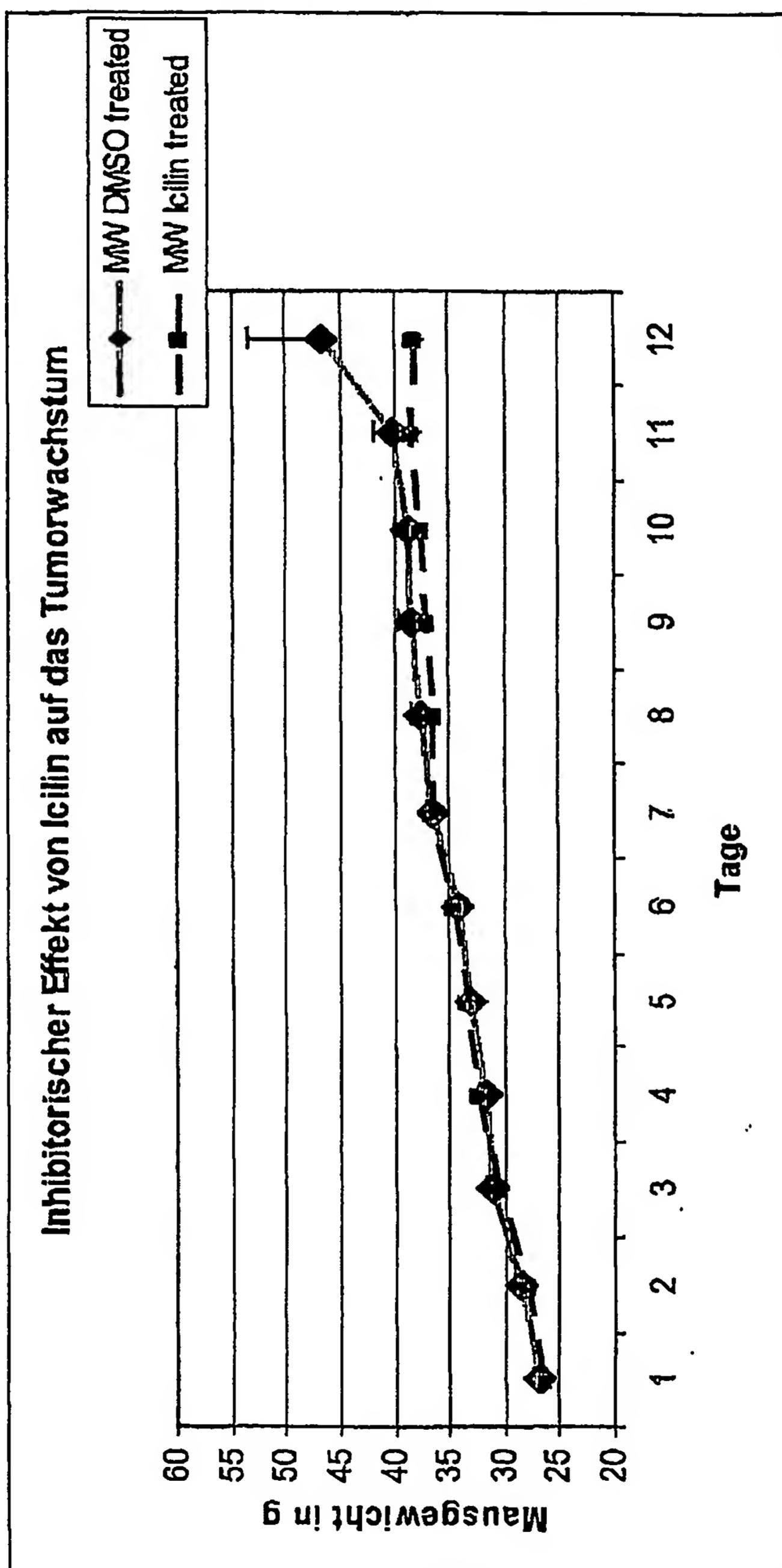
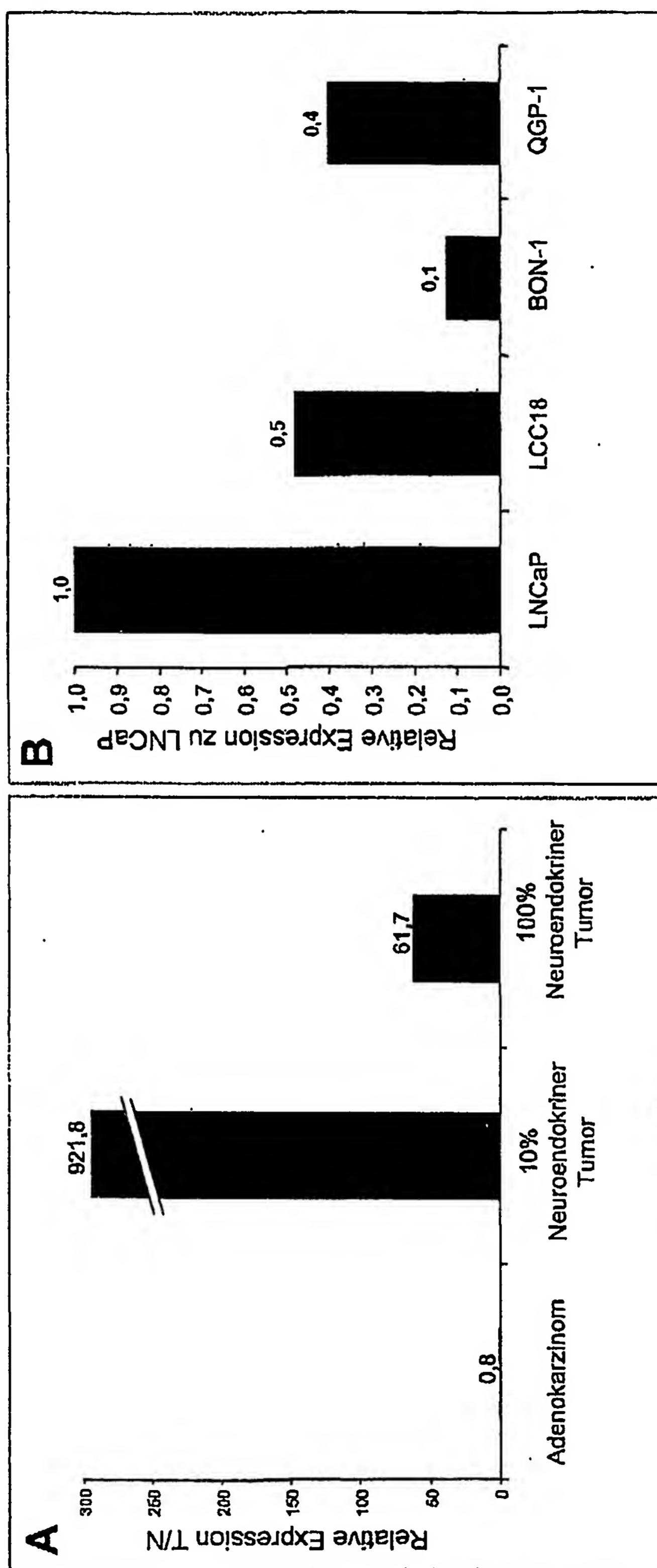


Fig. 9

Beispiel 6

Fig. 10



Beispiel 7

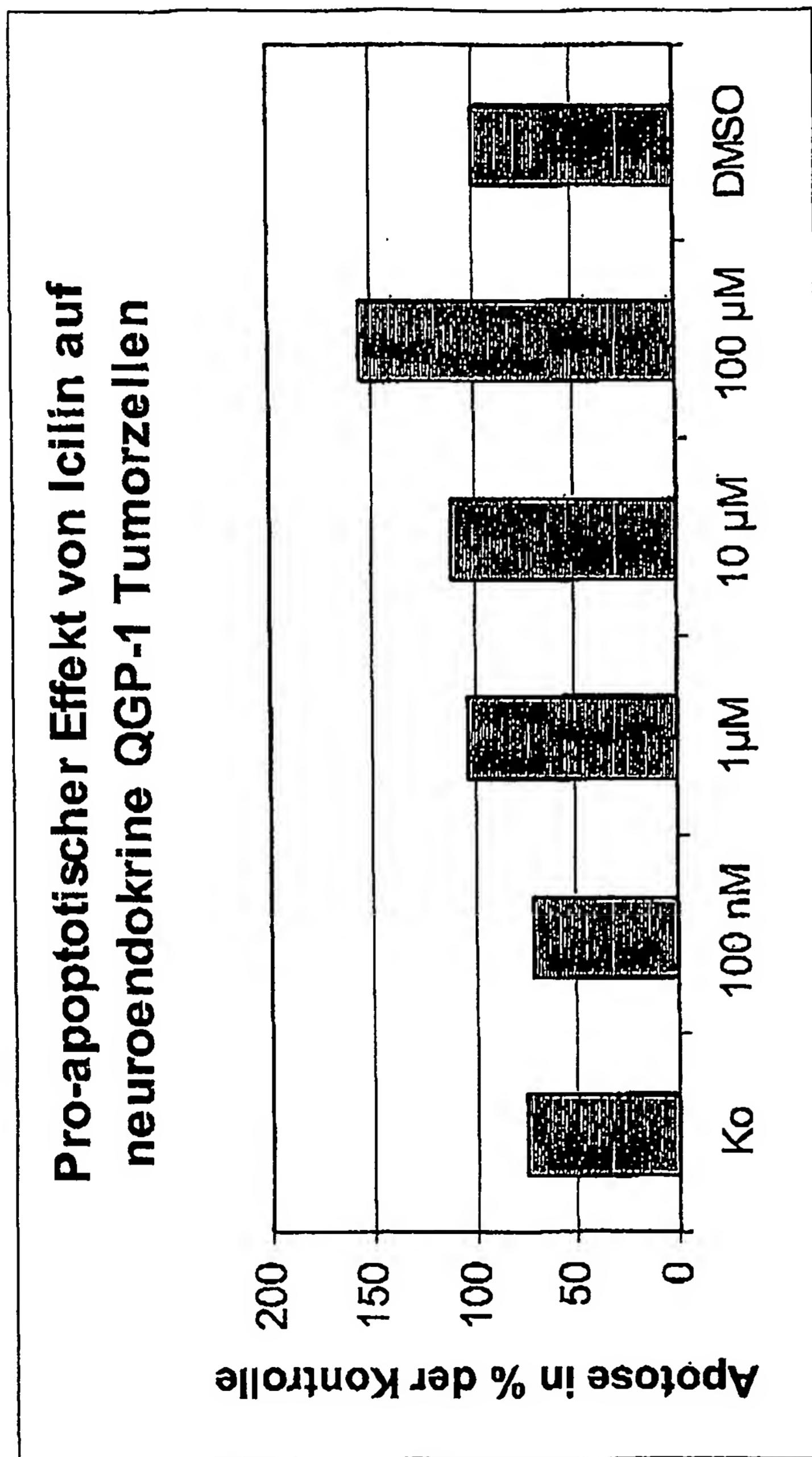
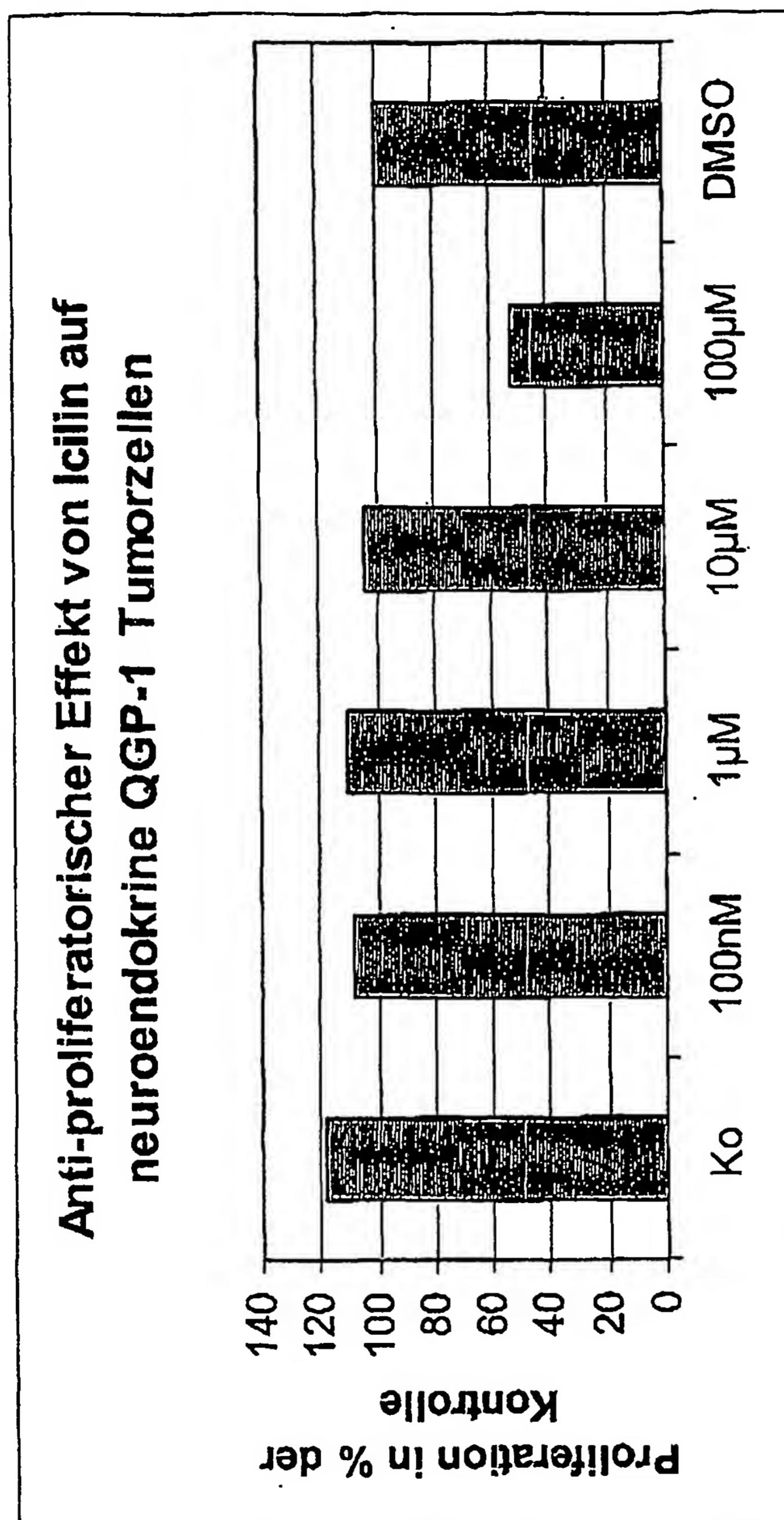


Fig. 11



Beispiel 9

Fig. 12

JCCS C'D PG7/P7D 17 JUN 2005

SEQUENCE LISTING

<110> metaGen Pharmaceuticals GmbH
<120> Verwendung einer TRPM8 aktivierenden Substanz zur Tumorbehandlung
<130> MET/DE/0227
<160> 17
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 1000
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 1
atccttgggt gaaagaaaaat cctgcttgac aaaaaccgtc acttaggaaa agatgtcctt 60
tcgggcagcc aggctcagca tgaggaacag aaggaatgac actctggaca gcacccggac 120
cctgtactcc agcgcgtctc ggagcacaga ctgttac agtcaaagcg acttggtgaa 180
tttattcaa gcaaattta agaaacgaga atgtgtcttc ttaccaaag attccaaggc 240
cacggagaat gtgtgcaagt gtggctatgc ccagagccag cacatggaag gcacccagat 300
caaccaaagt gagaaatgga actacaagaa acacaccaag gaatttccta ccgacgcctt 360
tgggatatt cagtttgaga cactgggaa gaaagggaaag tatatacgta tgtcctgcga 420
cacggacgacg gaaatcctt acgagctgct gaccagcac tggcacctga aaacacccaa 480
cctggtcatt tctgtgaccg gggcgccaa gaacttcgcc ctgaagccgc gcatgcgcaa 540
gatcttcagc cggctcatct acatcgacgca gtccaaaggt gcttggattc tcacggagg 600
caccattat ggcctgatga agtacatcggtt ggaggtgggtg agagataaca ccatcagcag 660
gagttcagag gagaatatttgg tggccattgg catagcagct tggggcatgg tctccaaaccg 720
ggacaccctc atcaggaatt gcgtatgtt ggtaccgggtg ggacaggagg aggtctgtta 780
ggtcacatgg aagaaagacc atggcatggg cctgtggcct gaaccctggg gctctgttat 840
ggagccagcc agatcatggg gaagtctgcc tttcaaggag tgcctttggg accttaaagg 900
aatggaaaac aaggatgacg tacctaatta actgctggga aagagttaac aatgaatgtt 960
tgttcatta aaatgtgttc tcagcaaaaa aaaaaaaaaaa 1000

```
<210> 2
<211> 391
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 2
gccgactact actacctact actactaaat tcacggccgg tcgactgaag acttggcaqa
```

acagctgctg gtctattcct gtgaagcttg ggggtggaaagc aactgtctgg agctggcggt 120
ggaggccaca gaccagcatt tcatcgcccc gcctgggtc cagaattttc tttctaagca 180
atggtatgga gagatttccc gagacaccaa gaactggaag attatcctgt gtctgtttat 240
tatacccttg gtgggctgtg gctttgtatc atttaggtac aaaccaaggc acataatcgt 300
gtgtgagtgt gtgtgccagt gtgtgtacat gcatccacat atgtgtgctc tcataatcgt 360
gattaaaaag cctggaaactt aaaaaaaaaa a 391

<210> 3

<211> 2136

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ggactacatt atttcactc taagattgat ccacatTTT actgttaagca gaaacttagg 60
agccaagatt ataatgctgc agaggatgct gatcgatgtg ttcttcttcc tgttcctctt 120
tgcgggtgtgg atggtggcct ttgcgtggcc aggcaaggga tccttaggca gaatgagcag 180
cgctggaggt ggatattccg ttcggtcatc tacgagccct acctggccat gttcggccag 240
gtgcccagtg acgtggatgg taagcctgac ttggctcaga tggaaacagc ttggaggagg 300
catttgctcc ctgaaccaac ccccagggct gccccggaga ccgcacttca gaagcacgct 360
cgtgaaacgg agtccaacat aacagagtac cacgtatgac tttgcccact gcacccatc 420
tggaaatgag tccaagccta ctgtgtgtgg agctggatga gcacaacctg ccccggttcc 480
ccgagtggat caccatcccc ctgggtgtca tctacatgtt atccaccaac atcctgctgg 540
tcaacctgct ggtcgccatg tttggctaca cggtgggcac cgtccagaga acaatgacca 600
ggtctggaag ttccagaggt..acttcctggt gcaggagtac tgcagccgcc tcaatatccc 660
cttcccccttc atcgtcttcg cttacttcta catgggtggtg aagaagtgtc tcaagtgttg 720
ctgcaaggag aaaaacatgg agtcttctgt ctgctgtttc aaaaatgaag acaatgagac 780
tctggcatgg gagggtgtca tgaaggaaaa ctacctgtc aagatcaaca caaaagccaa 840
cgacacctca gaggaaatga ggcacgttgc tagacaactg gatacaaagc ttaatgatct 900
caagggtctt ctgaaagaga ttgctaataa aatcaaataa aactgtatga actctaatagg 960
agaaaaatct aattatagca agatcatatt aaggaatgct gatgaacaat tttgctatcg 1020
actactaaat gagagatTTT cagacccttg ggtacatggt ggatgatTTT aaatcaccct 1080
agtgtgctga gaccttgaga ataaagtgtg tgattggttt catacttgaa gacggatata 1140

aaggaagaat attccttta tgtgttctc cagaatggtg cctgttctc tctgtgtctc 1200
aatgcctggg actggagggtt gatagttaa gtgtgttctt accgcctcct tttccttta 1260
atcttatttt tgatgaacac atatatagga gaacatctat cctatgaata agaacctgg 1320
catgcttac tcctgtattg ttatttggtt cattccaat tgattctcta ctccctt 1380
tttgtatta tgtgactaat tagttggcat attgttaaaa gtctctcaaa ttaggccaga 1440
ttctaaaaca tgctgcagca agaggacccc gctctttca ggaaaagtgt tttcatttct 1500
caggatgctt cttacctgtc agaggagggtg acaaggcagt ctcttgctct cttggactca 1560
ccaggctcct attgaaggaa ccaccccat tcctaaatat gtgaaaagtc gcccaaaatg 1620
caaccttgaa aggcaactact gactttgttc ttattggata ctcccttat ttatttttt 1680
tccattaaaa ataatagctg gctattatag aaatttagac catacagaga tgtagaaaga 1740
acataaatttgc tccccattac cttaaggtaa tcactgctaa caatttctgg atggttttc 1800
aagtctattt ttttctatg tatgtctcaa ttctcttca aaattttaca gaatgttata 1860
atactacata tatactttt atgtaagctt ttcaacttag tattttatca aatatgtttt 1920
tattatattc atagccttct taaacattat atcaataatt gcataatagg caacctctag 1980
cgattaccat aattttgctc attgaaggct atctccagtt gatcatggg atgagcatct 2040
tttgtcatga atcctattgc tgtatttggg aaaatttcc aaggttagat tccaataaaat 2100
atctatttat tattcaatat taaaaaaaaa aaaaaaa 2136

<210> 4

<211> 1813

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gctagaattt accagtaagc catctgattt cccagtaagc catcctgggc ttttcttgc 60
tgaaagcttt ttgattgctg atttcattt tcttcatttg ttgtttgtct gttcaggctt 120
tgtatttctt ctgatttcag gtctttgtaa gttgtacatt tctggatat ttccatttct 180
tctagttgtt ccaccttgtt tgcatataat tgttcataact agcccttct gatcccttcc 240
atttctatgc cctctgttgt aaggttgtct ttctcatttc tgactgtatt tatttgtatc 300
ttcttccttt tcttaaaagg tttgttgatt ttgtttatct tttcaaaaaa ccaactctta 360
cttcaatga tttttttcc cattgtttt caactctttt ttttaaaaat gtatttgct 420

cttggagttt ttgctctact ttaaacagct tactaaagtc attttactat taacaaatac	480
aaggctctt caaaagctcc tatagggaat acaaaaattc cccatctcct tataccagaa	540
aacaaagtta tttacaattc atcttaagtc tcttaatgat ctcaagggtc ttctgaaaga	600
gattgcta at aaaatcaa at aaaactgtat gaactcta at ggagaaaa at ctaattatag	660.
caagatcata ttaaggaatg ctgatgaaca attttgctat cgactactaa at gagagatt	720
ttcagacccc tgggtacatg gtggatgatt ttaaatcacc ctatgtgct gagacccctga	780
gaataaaagtg tgtgatttgtt ttcatacttg aagacggata taaaggaaga atatttcctt	840
tatgtgtttc tccagaatgg tgcctgtttc tctctgtgct tcaatgcctg ggactggagg	900
ttgatagttt aagtgtgttc ttaccgcctc cttttcctt taatcttatt tttgatgaac	960
acatatata gagaacatct atcctatgaa taagaacctg gtcatgctt actcctgtat	1020
tgttattttg ttcatttcca attgattctc tactttccc tttttgtat tatgtgacta	1080
attagttggc atattgtta aagtctctca aattaggcca gattctaaaa catgctgcag	1140
caagaggacc ccgctctctt cagaaaaagt gttttcattt ctcaggatgc ttcttacctg	1200
tcagaggagg tgacaaggca gtctcttgct ctcttgact caccaggctc ctattgaagg	1260
aaccaccccc attcctaaat atgtaaaaag tcgccccaaa tgcaaccttg aaaggcacta	1320
ctgactttgt tcttatttga tactcctctt atttattatt tttccattaa aaataatagc	1380
tggctattat agaaatttag accatacaga gatgtagaaa gaacataat tgccttccatt ..	1440
accttaaggt aatcactgct aacaatttct ggatggttt tcaagtctat ttttttcta	1500
tgtatgtctc aattctcttt caaaatttta cagaatgtta tcatactaca tatatacttt	1560
ttatgttaagc ttttcactt agtattttat caaatatgtt tttatttat tcatagcctt	1620
cttaaacatt atatcaataa ttgcataata ggcaacctct agcgattacc ataattttgc	1680
tcattgaagg ctatctccag ttgatcatttggatgagcat ctttgtgcat gaatcctatt	1740
gctgtatttg ggaaaatttt ccaaggtag attccaataa atatctattt attattcaat	1800
ataaaaaaaaaaa aaa	1813

<210> 5
<211> 986
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5
acctggctaa tttttgtatt tttagtagac acggggtttc accatgttgg ccaggctggt

60

ctcgaactcc tgacctcagg tgattgcct gcctcgccct cccaagtgtt gggattacag 120
gcgtgaacca ccgtgtccgg cctcagggtt tcttaattgc agagcttagt gtggataact 180
ttctgaaggt atctaacagg gaataggggc aaacaaatag ctgcatgctc ctgtcatagt 240
ccaccagcta tcatctgctt aaaacagctg cctgctggtc gccatgtttg gctacacgg 300
ggcaccgtc caggagaaca atgaccaggt ctggaagttc cagaggtact tcctggtgca 360
ggagtaactgc agccgcctca atatcccctt ccccttcattc gtcttcgctt acttctacat 420
ggtgtgaag aagtgcctca agtgttgctg caaggagaaa aacatggagt cttctgtctg 480
ctgtttcaaa aatgaagaca atgagactct ggcattggag ggtgtcatga aagaaaaacta 540
ccttgcataag atcaacacaa aaaccaacga cacctcagag gaaatgagggc atcgatttag 600
acaactggat acaaagatca tattaaggaa tgctgatgaa caattttgct atcgactact 660
aaatgagaga ttttcagacc cctgggtaca tggtgatga ttttaatca ccctagtgtg 720
ctgagacctt gagaataaaag tgtgtgattt gtttcataact tgaagacgga tataaaggaa 780
gaatatttcc tttatgtgtt tctccagaat ggtgcctgtt tctctctgtg tctcaatgcc 840
tgggactgga ggttgatagt ttaagtgtgt tcttacccgcc tccttttcc tttaatctta 900
ttttgatga acacatatat aggagaacat ctatcctatg aataagaacc tggtcattgt 960
ttaaaaaaaaaaaaaaa 986

<210> 6

<211> 929

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 6

ggcacgagggc tgcctttctc caccagagac tcttcctcag ggaggacttg gtgaattttta 60
ttcaagcaaa ttttaagaaa cgagaatgtg tcttctttac caaagattcc aaggccacgc 120
tcaatgaaat ctttccttcc tgtccacacc atcgtgctta tcagggagaa tgtgtgcaag 180
tgtggctatg cccagagcca gcacatggaa ggcacccaga tcaaccaaag tgagaaatgg 240
aactacaaga aacacaccaa ggaatttcct accgacgcct ttggggatat tcagtttgag 300
acactgggaa agaaaggaa gtatatacgt ctgtcctgctg acacggacgc ggaaatcctt 360
tacgagctgc tgaccaggca ctggcacctg aaaacacccca acctggtcat ttctgtgacc 420
ggggcgcca agaacttcgc cctgaagccg cgcatgacca agatcttcag ccggctcatc 480

tacatcgcbc agtccaaagg tgcttgatt ctcacggag gcaccatta tggccgatga 540
agtacatcg ggaggtggtg agagataaca ccatcagcag gagttcagag gagaatattg
tggccattgg catagcagct tggggcatgg tctccaaccg ggacaccctc atcaggaatt
gcgatgctga ggtaccggtg ggacaggagg aggtctgcta ggtcacatgg aagaaagacc 720.
atggcatggg cctgtggcct gaaccctggg gctctgtat ggagccagcc agatcatggg
gaagtctgcc tttcaaggag tgcctttggg accttaaagg aattgaaaac aaggatgacg
tacctaatta actgctggga aagagttaac aatgaatgtt ttgttcatta aaatgtgttc 900
tcagcaatct caaaaaaaaaaaaaaaa 929

<210> 7
<211> 735
<212> DNA
<213> homo sapiens
<400> 7
ttggccttca gagcaaagaa ggagatctgc atctctacac ccagatggag aatcaccctc 60
actttgcagc tgaaggcaat gtggagttga tgttatTTTA taccatttat ttttattatc
tcttcacaac aaacctacta agtcaatgtt atgattccat gctgcaaaca aggaaattaa 180
gcctcagcaa tcctgatatt ctggaacaga acaatcctt aagagatttg gtattgaaga
ccttgttggaa aatggatcag acattgccc gaccactgtc cagacccaac actggaataa 300
cccaggagag cttcgtgctt acctccatc ggcggtcatt ggtgaaaatc tcatttcattgg .. 360
ctaagtccag ctggttccac tccagcagaa gcttcagctg cccattccag ttatcattgt
cttgctcact ggtgctgaag gctgtgagag ggcaggaaaa gactcaactc accaaaggct
cagaaataag agtgagaacc attcagtgtg gccattatc agagctgtt atcacagatc
gtatTTTTC ttAAATGGTA tctaccagaa gaagacagcc agcttcgtat actaacaaac 540
cacaatggaa gatggccgta tttatcattg ccttagcat gttaaagggt acataaccaca
ttgaccctgg cagaagcatt cctgatgtgt tgaaaaatt aagagaaata acagttctt
ggcaataaaaa aaaaaa 735

<210> 8
<211> 84
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 8

Gly Leu Gln Ser Lys Glu Gly Asp Leu His Leu Tyr Thr Gln Met Glu
1 5 10 15

Asn His Pro His Phe Ala Ala Glu Gly Asn Val Glu Leu Met Leu Phe
20 25 30

Tyr Thr Ile Tyr Phe Tyr Tyr Leu Phe Thr Thr Asn Leu Leu Ser Gln
35 40 45

Cys Tyr Asp Ser Met Leu Gln Thr Arg Lys Leu Ser Leu Ser Asn Pro
50 55 60

Asp Ile Leu Glu Gln Asn Asn Pro Leu Arg Asp Leu Val Leu Lys Thr
65 70 75 80

Leu Leu Glu Met

<210> 9
<211> 249
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 9
gtaccgggtgg gacaggagga ggtctgctag gtcacatgga agaaagacca tggcatggc 60
ctgtggcctg aaccctgggg ctctgtatg gagccagcca gatcatgggg aagtctgcct .. 120
ttcaaggagt gcctttggga ccttaaagga attgaaaaca aggatgacgt acctaattaa 180
ctgctggaa agagttaaca atgaatgtt tgttcattaa aatgtttct cagcaaaaaa 240
aaaaaaaaaa 249

<210> 10
<211> 115
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 10
gtacaaacca aggcacataa tcgtgtgtga gtgtgtgtgc cagtgtgtgt acatgcattc 60
acatatgtgt gctctcatgt aaatgattaa aaagcctgga acttaaaaaa aaaaa 115

<210> 11
<211> 127
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
gttaaggcctga cttggcttag atggaaacag cttggaggag gcatttgctc cctgaaccaa 60
ccccccagggc tgccccggag accgcacttc agaagcacgc gcgtgaaaacg gagtccaaca 120
taacaga 127

<210> 12
<211> 571
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 12
gctagaattt accagtaagc catctgattt cccagtaagc catcctggc ttttctttgt 60
tgaaagcttt ttgattgctg attttcattt tcttcattt ttgtttgtct gttcaggctt 120
tgtatttctt cttgattcag gtctttgtaa gttgtacatt tctggatat ttccatttct 180
tctaggttgt ccaccttggt tgcatataat tgttcataact agcccctct gatcccttcc 240
atttctatgc cctctgttgt aagggttgtct ttctcatttc tgactgtatt tatttgtatc 300
ttcttcctt tcttaaaagg tttgttgatt ttgttatct tttcaaaaaa ccaactctta 360
ctttcaatga tttttttcc cattgtttt caactctctt tttaaaaat gtatttgct 420
cttggagttt ttgctctact ttaaacagct tactaaagtc attttactat taacaaatac 480
aaggctctt caaaagctcc tatagggaat aaaaaatttc cccatctcct tataccagaa 540
aacaaagtta tttacaattc atcttaagtc t 571

<210> 13
<211> 271
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 13
acctggctaa tttttgtatt tttagtagac acggggtttc accatgttgg ccaggctgg 60
ctcgaactcc tgacctcagg tgattgcct gcctcgccct cccaaatgtt gggattacag 120
gcgtgaacca ccgtgtccgg cctcagggtt tcttaattgc agagcttagt gtggataact 180
ttctgaaggt atctaacagg gaataggggc aaacaaatag ctgcatgctc ctgtcatagt 240
ccaccagcta tgatctgctt aaaacagctg c 271

<210> 14
<211> 35
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 14

ctgcctttct ccaccagaga ctcttcctca gggag

35

<210> 15
<211> 46
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 15
gctcaatgaa atccttcctt cctgtccaca ccatcgtgct tatcag 46

<210> 16
<211> 255
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 16
gtaccggtag gacaggagga ggtctgctag gtcacatgga agaaagacca tggcatggc 60
ctgtggcctg aaccctgggg ctctgtgatg gagccagcca gatcatgggg aagtctgcct 120
ttcaaggagt gcctttggga ccttaaagga attaaaaaca aggatgacgt acctaattaa 180
ctgctggaa agagttaaca atgaatgttt tgttcattaa aatgtgttct cagcaatctc 240
aaaaaaaaaaa aaaaa 255

<210> 17
<211> 128
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 17
tcaggttttc ttaattgcag agcttagtgt ggtataactt ctgaaggat ctaacaggga .. 60
atagggcaa acaaatacgct gcatgctccgt gtcatagtc accagctatg atctgcttaa 120
aacagctg 128

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.